KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KOCAELİ'DE YAYGINLIK GÖSTEREN SİVRİSİNEK (DIPTERA: CULİCİDAE) TÜRLERİNİN FİLOGENETİK ANALİZİ

SERKAN DEDE

KOCAELİ 2020

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KOCAELİ'DE YAYGINLIK GÖSTEREN SİVRİSİNEK (DIPTERA: CULICIDAE) TÜRLERİNİN FİLOGENETİK ANALİZİ

SERKAN DEDE

Doç.Dr. Fikriye POLAT
Danışman, Kocaeli Üniv.

Doç.Dr. Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.

Prof. Dr. Songül BUDAK DİLER
Jüri Üyesi, Niğde Ömer Halisdemir Üniv.



Tezin Savunulduğu Tarih: 23.01.2020

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, Kocaeli'de yaygınlık gösteren sivrisinek türlerinin filogenetik analizinin yapılarak gelecekteki çalışmalara ışık tutması amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans öğrenimimde desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve ışığıyla yol gösteren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Fikriye Polat'a, bu süreçte beni yalnız bırakmayan ve desteklerini her zaman hissettiğim canım aileme ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmamı destekleyen Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje Numarası: 2019-042) birimine şükranlarımı sunarım.

Ocak – 2020 Serkan DEDE

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
ŞEKİLLER DİZİNİ iii
TABLOLAR DİZİNİ iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ vi
ÖZET vii
ABSTRACT viii
GİRİŞ 1
1. GENEL BİLGİLER 2
1.1. Sivrisineklerin Genel Biyolojisi 2
1.2. Sivrisineklerin Taksonomisi 5
1.3. Moleküler Tanımlama 10
1.3.1. DNA barkodlama 10
2. MATERYAL METOD 12
2.1. Örneklerin Toplanması 12
2.2. DNA İzolasyonu 15
2.3. DNA Konsantrasyonunun Ölçümü 16
2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) 16
2.4.1. COI Gen bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu 17
2.4.2. ITS2 Gen bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu 18
2.5. Agaroz Jel Elektroforezi 18
2.6. DNA Dizi Analizi 18
2.7. Filogenetik Analiz 19
3. BULGULAR 21
3.1. *Aedes geniculatus* 21
3.2. *Aedes albopictus* 24
3.3. *Anopheles funestus* 26
3.4. *Anopheles plumbeus* 29
3.5. *Culex species* 31
3.6. *Culex torrentium* 36
3.7. *Culiseta longiareolata* 38
3.8. ITS2 Barkod Geni Açısından *Culex species* 40
4. TARTIŞMA 53
4. 1. *Culex pipiens* Kompleks Türleri 54
4.1.1. COI 54
4.1.2. ITS2 56
4.2. Aedes 58
4.3. Anopheles 59
4.4. Culiseta 61
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 62
KAYNAKLAR 64
KİŞİSEL YAYINLAR VE ESERLER 71
ÖZGEÇMİŞ 72

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. *Ae. geniculatus*'a ait COI gen bölgesi için ML metodu ile oluşturulan moleküler filogenetik ağaç 24

Şekil 3.2. *Ae. albopictus*'a ait COI gen bölgesi için ML metodu ile oluşturulan moleküler filogenetik ağaç 26

Şekil 3.3. *An. funestus*'a ait COI gen bölgesi için ML metodu ile oluşturulan moleküler filogenetik ağaç 29

Şekil 3.4. *An. plumbeus*'a ait COI gen bölgesi için ML metodu ile oluşturulan moleküler filogenetik ağaç 31

Şekil 3.5. *Cx. pipiens complex sp.*'e ait COI gen bölgesi için ML metodu ile oluşturulan moleküler filogenetik ağaç 35

Şekil 3.6. *Cx. torrentium*'a ait COI gen bölgesi için ML metodu ile oluşturulan moleküler filogenetik ağaç 38

Şekil 3.7. *Cs. longiareolata*'ya ait COI gen bölgesi için ML metodu ile oluşturulan moleküler filogenetik ağaç 40

Şekil 3.8. *Cx. pipiens complex sp.* örneklerinin ve dış grupların ITS2 gen bölgesi ile ML metodu kullanılarak oluşturulmuş filogenetik ağaç 44

Şekil 3.9. S4 (*Ae. geniculatus*), S9 (*An. plumbeus*), S18 (*Cx. pipiens complex sp.*), S19 (*An. funestus*), S25 (*Cx. torrentium*), S34 (*Cs. longiareolata*), S38 (*Cx. pipiens complex sp.*), S42 (*Ae. albopictus*) ve S68 (*Cx. pipiens complex sp.*) ITS2 sivrisinek örneklerimize ait agaroz jel elektroforezi 45

Şekil 3.10. S3 *Culex sp.* sivrisinek örneğimize ait 5.8S rDNA-ITS2-28S rDNA dizisi 45

Şekil 3.11. *Culex* örneklerine ait ITS2 gen bölgesi dizilerinin MEGA X programı üzerindeki FASTA görünümünü göstermektedir 46

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Sivrisinek örneklerine ait NCBI erişim numaraları, alındığı koordinatlar ve tarih bilgileri 12

Tablo 2.2. Mitokondriyal COI bölgesinin PZR işlemlerinde kullanılan ileri ve geri primerler..... 17

Tablo 2.3. Mitokondriyal COI bölgesine ait PZR koşulları..... 17

Tablo 2.4. Mitokondriyal ITS2 bölgesinin PZR işlemlerinde kullanılan ileri ve geri primerler..... 18

Tablo 2.5. Mitokondriyal ITS2 bölgesine ait PZR koşulları. 18

Tablo 2.6. COI geni için filogenetik ağaçlarda kullanılmak üzere NCBI'dan elde edilen çeşitli sivrisinek türlerine ait erişim numaraları 19

Tablo 2.7. ITS2 geni için filogenetik ağaçlarda kullanılmak üzere NCBI'dan elde edilen çeşitli sivrisinek türlerine ait erişim numaraları 20

Tablo 3.1. *Ae. geniculatus* COI gen bölgesine ait nükleotid kompozisyonu (%)..... 21

Tablo 3.2. *Ae. geniculatus* COI gen bölgesi için nükleotid çifti frekansları 22

Tablo 3.3. *Ae. geniculatus* COI geni için Substitüsyon matrisi..... 22

Tablo 3.4. *Ae. geniculatus* COI geni için iç ve dış gruplar arasında genetik uzaklık matrisi..... 23

Tablo 3.5. COI gen bölgesine ait nükleotid kompozisyonu (%)..... 24

Tablo 3.6. *Ae. albopictus* COI gen bölgesi için nükleotid çifti frekansları 25

Tablo 3.7. *Ae. albopictus* COI geni için substitüsyon matrisi 25

Tablo 3.8. *Ae. albopictus* COI geni için iç ve dış gruplar arasında genetik uzaklık matrisi..... 26

Tablo 3.9. *An. funestus* COI geni için nükleotid kompozisyonu (%)..... 27

Tablo 3.10. *An. funestus* COI geni için nükleotid çifti frekansları 27

Tablo 3.11. *An. funestus* COI geni için substitüsyon matrisi..... 28

Tablo 3.12. *An. funestus* COI geni için iç ve dış gruplar arasında genetik uzaklık matrisi..... 28

Tablo 3.13. *An. plumbeus* COI geni için nükleotid kompozisyonu (%)..... 29

Tablo 3.14. *An. plumbeus* COI geni için nükleotid çifti frekansları 30

Tablo 3.15. *An. plumbeus* COI geni için substitüsyon matrisi..... 30

Tablo 3.16. *An. plumbeus* COI geni için iç ve dış gruplar arasında genetik uzaklık matrisi..... 31

Tablo 3.17. *Cx. pipiens complex sp.* COI geni için nükleotid kompozisyonu (%)..... 32

Tablo 3.18. *Cx. pipiens complex sp.* COI geni için Nükleotid çifti frekansları..... 33

Tablo 3.19. *Cx. pipiens complex sp.* COI geni için substitüsyon matrisi 33
Tablo 3.20. *Cx. pipiens complex sp.* COI geni için iç ve dış gruplar arasında genetik uzaklık matrisi 34
Tablo 3.21. *Cx. torrentium* COI geni için nükleotid kompozisyonu (%) 36
Tablo 3.22. *Cx. torrentium* COI geni için nükleotid çifti frekansları 36
Tablo 3.23. *Cx. torrentium* COI geni için substitüsyon matrisi 37
Tablo 3.24. *Cx. torrentium* COI geni için genetik uzaklık matrisi.....37
Tablo 3.25. *Cs. longiareolata* COI geni için nükleotid kompozisyonu (%).....38
Tablo 3.26. *Cs. longiareolata* COI geni için nükleotid çifti frekansları 39
Tablo 3.27. *Cs. longiareolata* COI geni için substitüsyon matrisi.....39
Tablo 3.28. *Cs. longiareolata* COI geni için genetik uzaklık matrisi 40
Tablo 3.29. *Cx. pipiens complex sp.* ITS2 geni için nükleotid kompozisyonu (%).....41
Tablo 3.30. *Cx. pipiens complex sp.* ITS2 geni için nükleotid çifti frekansları 42
Tablo 3.31. *Cx. pipiens complex sp.* ITS2 geni için substitüsyon matrisi 42
Tablo 3.32. Culex sp. örneklerinin ITS2 gen bölgesi genetik uzaklık matrisi.....43
Tablo 3.33. 34 adet *Culex* cinsi sivrisinek örneklerinin NCBI GenBanktan elde edilen *Culex pipiens* kompleksi türlere ait ITS2 ve COI dizileri ile karşılaştırılması.....48
Tablo 5.1. Kocaeli sınırları içinde yaygınlık gösteren sivrisineklere ait türler 63

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	:	Yüzde
=	:	Eşittir
µl	:	Mikrolitre
g	:	G Kuvveti
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
ng/µl	:	Nanogram/Mikrolitre
^{o}C	:	Santigrat Derece
S	:	Svedberg Birimi / Sedimentasyon Katsayısı

Kısaltmalar

A	:	Adenin
Ae.	:	*Aedes*
An.	:	*Anopheles*
bç	:	Baz Çifti
C	:	Sitozin
COI	:	Sitokrom Oksidaz Altünite 1
Cs.	:	*Culiseta*
Cx.	:	*Culex*
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
ECDC	:	European Center for Diseases Prevention and Control (Avrupa Hastalıkları Önleme ve Kontrol Merkezi)
EDTA	:	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
F	:	Forward (İleri)
G	:	Guanin
ITS2	:	Internal Transcribed Spacer 2
ML	:	Maksimum Likelihood (Maksimum Olabilirlik)
mtDNA	:	Mitokondriyal DNA
NCBI	:	National Center for Biotechnology Information (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi)
Oc.	:	*Ochlerotatus*
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R	:	Reverse (Geri)
RNA	:	Ribonükleik asit
rDNA	:	Ribozomal DNA
rRNA	:	Ribozomal RNA
T	:	Timin
TAE	:	Tris Asetat EDTA
tRNA	:	Taşıyıcı RNA
UV	:	Ultra Viyole

KOCAELİ'DE YAYGINLIK GÖSTEREN SİVRİSİNEK (DIPTERA: *CULICIDAE*) TÜRLERİNİN FİLOGENETİK ANALİZİ

ÖZET

Bu çalışmada, Kocaeli yöresinden toplanan sivrisinek örneklerinin filogenetik analiz yöntemiyle tür bazında tayin edilmesi amaçlandı. Bunun için Haziran 2017-Eylül 2018 tarihleri arasında toplanan 54 sivrisinek örneğinin DNA'ları izole edildi. Ardından mitokondrial Sitokrom Oksidaz Altünite I (COI) barkod geni, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile amplifiye edilip DNA dizi analizleri yapıldı. Filogenetik analizler GeneBank'tan alınan dizilerle birlikte değerlendirilerek gerçekleştirildi ve türler arası ilişkiler belirlendi. COI barkod geni ile *Aedes*, *Anopheles* ve *Culiseta* cinsine ait sivrisinekler, tür bazında yüksek benzerlik oranları ile tespit edilirken *Culex pipiens* kompleksi türlerin ayrımı sağlanamadı. Yalnızca *Culex torrentium* yüksek benzerlik oranı ile tespit edilebildi. *Culex pipiens* kompleksi türlerin ayırımını yapmak için ikinci aşamada Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) gen bölgesi kullanıldı. Ancak ITS2 barkod geni de *Culex* türlerinde COI gibi yüksek ayırım gücüne sahip değildi. Çalışılan gen bölgelerine ait tüm diziler MEGA X programına yüklenerek modelleme yöntemleri ve mesafeleri belirlendi. Bootstrap 1000'de filogenetik ağaçları oluşturuldu. Sonuç olarak, Kocaeli ilinde yapılan bu çalışmada *Aedes geniculatus* (n=10), *Aedes albopictus* (n=7), *Anopheles funestus* (n=1), *Anopheles plumbeus* (n=1), *Culiseta longiareolata* (n=1), *Culex torrentium* (n=1) ve *Culex pipiens* kompleksi (n=33) sivrisinekler tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: COI, Culicidae, Filogenetik, ITS2, Sivrisinek.

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF MOSQUITO (DIPTERA: *CULICIDAE*) SPECIES COMMON IN KOCAELI

ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine the species level of mosquito samples from a region of Kocaeli using phylogenetic analysis method. For this, DNAs of 54 mosquito samples collected between June 2017 and September 2018 were isolated. Then Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) barcode gene was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) technique and sequenced. Phylogenetic analyses were evaluated together with the sequences obtained from GenBank and relationships between species were determined. Mosquitoes belonging to the genus of Aedes, Anopheles and Culiseta were detected to be having high similarity rates on the basis of COI barcode gene, whereas the species of *Culex pipiens* complex were not distinguished. Only *Culex torrentium* was detected with a high similarity rate. For the second step, Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) gene region was used to detect the species of *Culex pipiens* complex. However, similar with COI, ITS2 barcode gene did not have high separation power in Culex species. After all sequences of the gene regions were loaded into MEGA X program, their modeling methods and distances were determined. Phylogenetic trees were created in Bootstrap 1000. In conclusion, in this study conducted in Kocaeli, mosquitoes were detected as follows: *Aedes geniculatus* (n = 10), *Aedes albopictus* (n = 7), *Anopheles funestus* (n = 1), *Anopheles plumbeus* (n = 1), *Culiseta longiareolata* (n = 1), *Culex torrentium* (n = 1) and *Culex pipiens* complex (n = 33).

Keywords: COI, Culicidae, Phylogenetic, ITS2, Mosquito.

GİRİŞ

Sivrisinekler, insan ve hayvanlardan kan emmelerinin yanısıra virüs, bakteri, protozoa ve nematodları içeren geniş bir grup patojenin taşınmasından sorumludurlar. Bu yolla da Sıtma, Batı Nil Ateşi, Deng Humması, Sarı Humma, Cikungunya Ateşi, Arboviral Ensefalitler ve Filariasis gibi birçok önemli enfeksiyonun yayılmasından sorumludurlar (Marquardt, 2004; Becker ve diğ., 2010). Vektörle mücadele masrafları yüksek olmasına rağmen bu miktarlar, sivrisineklerin vektörlük yaparak yaydıkları hastalıkların tedavisi için harcanan giderlerden çok daha azdır (James ve Harwood, 1969). Bu sebeple bir bölgede potansiyel vektör sivrisineklerin var olduğunun tespiti oldukça önemlidir. Vektörlük haricinde insanlara verdiği rahatsızlık da kimi zaman önemli boyutlara ulaşabilmektedir (Öter, 2007).

Çevre ve halk sağlığı kapsamında şehirlerde sürdürülen sivrisinekle mücadele çalışmaları, konu üzerine bilimsel çalışmaları ve bir kontrol mekanizmasını gerekli kılmaktadır. Bir bölgede var olan türlerin tespit edilmesi ve habitat tiplerinin belirlenmesi o bölgede yapılması planlanan sivrisinek mücadelesi açısından önem teşkil etmektedir (Öter, 2007).

Kocaeli'de görülen sivrisinek türlerinin filogenetik analizi üzerine önceden yapılmış kapsamlı bir bilimsel çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma Kocaeli'de yaygınlık gösteren sivrisinek türlerinin filogenetik olarak belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışma, toplanan ergin sivrisinek örneklerinden elde edilen DNA verileri üzerinden yürütülmüştür.

1. GENEL BİLGİLER

Güney Afrika'daki bir mağarada yapılan araştırmalar sonucu M.Ö. 77.000'li yıllarda insanlar tarafından sivrisinekleri uzaklaştırmak için çeşitli bitkiler içeren yataklar yapıldığı tespit edilmiştir (Wadley ve diğ., 2011). Filarial parazit *Wuchereria bancrofti*'nin *Culex quinquefasciatus* türü sivrisinek ile taşındığının belirlenmesi ile sivrisineklerin salgın hastalıklara sebep olduğu, ilk kez 1878'de fark edilmiştir. Küba'da *Aedes aegypti* türünün sarı humma hastalığını bulaştırdığının Carlos Finlay tarafından 1881 yılında keşfedilmesi, sıtma parazitinin yaşam döngüsünün içerisinde sivrisineklerin de bulunduğunun Ronald Ross tarafından 1898 yılında keşfedilmesi ve bu iki sonucun Walter Reed ve ekibi tarafından 1900 yılında kanıtlanması, bu canlıların insan ve toplum sağlığı açısından önemli bir faktör olduklarını ortaya koymuştur (James ve Harwood, 1969). Bu çalışmalarla birlikte, sivrisinekler üzerine yapılan her tür araştırma çok daha önemli hale gelmiştir (Günay, 2015).

1.1. Sivrisineklerin Genel Biyolojisi

Sivrisinekler, Diptera takımına bağlı Nematocera alt takımında, Culicidae ailesi içerisinde yer almaktadır. Tam metamorfoz geçirip gelişimlerini tamamlamak için sulak habitatlara ihtiyaçlar duyarlar. Yumurtadan çıktıktan sonra geçirdiği dört larval dönemi pupa dönemi takip etmektedir. Bu dönemde hareket ve beslenmeden kesilirler. Koza içindeki larvanın iç organlarının kaynaşarak ergine has şekillere dönüştüğü koza evresini geçirerek erişkin döneme geçerler (Becker ve diğ., 2003).

Sivrisinekler tropikal, subtropikal ve ılıman iklim kuşaklarında yaygınlık göstermekte ancak okyanuslar, yüksek dağlar ve geniş çöller, yayılmalarını engelleyici rol oynamaktadır. Sivrisinekler çok kesin olmamakla beraber, paleontolojik verilere göre ilk çağın 350 milyonuncu yılından sonra, Karbonifer döneminde diğer kanatlı eklembacaklılarla birlikte evrimsel süreç içinde yer almıştır (Aldemir, 2003).

Sivrisineklerin yumurtladığı, larva ve pupaların yaşayıp geliştiği ve pupalarından çıktığı küçük ve büyük her durgun su birikintisi sivrisineklerin üreme alanıdır. Bu alanlar doğal olarak oluşabildikleri gibi insan yapımı (yapay) olarak da oluşabilirler. Her çeşit göl, gölet, bataklık, havuz, doğal çukurlar, taş oyukları, ağaç kovukları, çayır ve ormanlarda birikmiş kar, yağmur ve sulama suları, yavaş akan akarsuların

kıyı kesiminde oluşan ve su bitkileri/yosunlar ile kaplı durgun kısımlar, kanallar, terk edilmiş kuyular, sarnıçlar, çeltik tarlaları, çeşme yalaklar, konutların çevresine bırakılan içinde su depolanan her çeşit kap, otomobil lastikleri, foseptik çukurları, bataklık kıyısındaki hayvan ayak izleri, fabrika atık suları, vb. yerlerdeki temiz, az tuzlu, tuzlu ve kirli sular, sivrisinek türlerinin üreme alanlarıdır (Aldemir, 2003; Merdivenci, 1984; Bagirov ve diğ., 1986; Alten, 1993; Boşgelmez ve diğ., 1994; Alten ve Boşgelmez, 1996; Alptekin ve Kasap, 1997).

Sivrisinekler, hayat döngülerinde, yumurta, larva, pupa ve ergin evreler bulunduğu için tam başkalaşım gösteren canlılardır (holometabol). Yumurta ve yumurtlama şekilleri, cins ve türlerin birbirinden kolayca ayırt edilebilmesini sağlar. *Anopheles* (*An.*) türleri tek seferde 200-400, *Culex* (*Cx.*) türleri ise 75-150 yumurta bırakır (Merdivenci, 1984). Sivrisinekler yumurtalarını tek tek bırakabildikleri gibi paket halinde de bırakabilirler. *Anopheles, Aedes* (*Ae.*) ve *Ochlerotatus* (*Oc.*) türleri yumurtalarını tek tek bırakırken*, Culex* ve *Culiseta* (*Cs.*) türleri ise paket halinde bırakır. Sivrisinek yumurtaları genel olarak uzun ve oval olurken, kahverengi ya da siyaha yakın bir renge sahip olabilirler ve 1 mm kadar uzunluğa ulaşabilirler. Yumurtaların alt yüzeyleri üst yüzeylerinden daha dış bükeydir. Sivrisineklerde yumurta evresinden ergin evresine kadar geçen süre, türe, suyun fizikokimyasal özelliklerine, iklim koşullarına ve besin faktörlerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Merdivenci, 1984; Marshall, 1938; Clements, 1963; Snow, 1990; Alten ve Çağlar, 1998).

Sivrisineklerin türe özgü davranış göstermeleri, larvaların doğadaki dağılımlarının belirlenmesinde önemli rol oynar (Bentley ve Day, 1989).

Yumurta inkübasyon süresi, larva ve pupa gelişme süresi, iklimsel koşullara, suyun fizikokimyasal yapısına ve diğer değişkenlere bağlıdır. Larva süresi, bir hafta ile birkaç ay arasında değişkenlik gösterir. Sıcaklık değişimiyle larva gelişimi arasında ters orantı vardır. Örneğin: *Anopheles* larvaları, 15 ºC'de 40-45 günde, 20 ºC'de 20-25 günde, 25 ºC'de 15 günde ve 30ºC'de 12 günde gelişimlerini tamamlar. Sivrisinek larvaları en iyi 22-25 ºC sıcaklık aralığında gelişimini tamamlar. Optimum şartlarda larva gelişim süresi 10-15 gündür (Merdivenci, 1984).

Sivrisinek larva ve pupaları suda yaşarlar. Yumurtanın açılması anında larva, başındaki çok ince ve keskin küçük çıkıntıyla yumurta kabuğunu keserek dışarı çıkar. Larva yumurtadan çıktığı anda yarı saydam, parlak ve sarımsı-beyaz renklidir.

Pigment oluşumu daha sonra gerçekleşir. Larvalar son derece aktif bir haldedir; solunum için sürekli su yüzeyine çıkar ve hava alıp tekrar suyun derinliklerine dalarlar. Larvalar gelişimleri boyunca üç sefer gömlek değiştirirler ve dört evre geçirirler. *Anopheles* larvasında sifon (solunum borusu) yoktur, bunlar karın bölgesindeki palme kıllarının yardımıyla vücutlarını suyun yüzeyine paralel bir şekilde tutarlar ve solunum delikleriyle havadan oksijen alırlar. *Culex, Aedes, Culiseta, Orthopodomyia* ve *Uranotaenia* larvalarının sifonu vardır. Sifonla havadan oksijen almak üzere suyun yüzeyine yapıştıkları zaman, baş bölgesi aşağı doğru yönelir ve vücudu açı oluşturacak şekilde durur (Aldemir, 2003).

Açık alanlarda durgun suların yüzeyi bazı bakteri türleri tarafından oluşturulan jelatinimsi bir zar tabakasıyla örtülüdür. Zar tabakasının üst yüzeyinde polenler, mantar sporları, havadan düşen diğer başka maddeler, tabakanın alt yüzeyinde ise, çeşitli flagellatlar ve bazı Protozoa türleri bulunur. Sivrisinek larvaları bu ince zar tabakasını kesip tabakanın altındaki ve üstündeki organizmaları veya maddeleri besin olarak kullanır. Organik maddeler, larvaların beslenmesinde önemlidir; ancak larva besininin önemli bir kısmını mikroorganizmalar oluşturur. Sivrinsek larvalarının mide içeriği incelenmiş, başta alg türleri olmak üzere bakteri, rotifer, spor ve Protozoa türlerinin bulunduğu görülmüştür (Clements, 1963; Merritt ve diğ., 1992).

Sivrisinek pupası virgül şeklindedir (Merdivenci, 1984; Snow, 1990). Pupa beslenmez, yer değiştirme hareketinde bulunur ve su yüzeyine çıkarak solunum deliği ile havadan oksijen alır. Erginleşme anında pupanın karın bölgesi su yüzeyine paralel bir konum alır ve hava yutarak pupadan çıkma işi kolaylaştırılır. Pupadan çıkan ergin kanatlarını ve bacaklarını kurutarak sudan çıkar (Bedir, 2008).

Sivrisinek erginleri, larva ve pupa evrelerinin aksine karada yaşarlar. Ergin sivrisinekler, konukçu tercihi, barınak seçimi ve üreme davranışları bakımından birbirlerinden ayrılırlar. Ekzofilik (açık alanda faal olan) türler, çoğunlukla ağaç kovukları, mağaralar, pamuk tarlaları ve orman içlerinde yaşamalarının yanında gün boyunca insan ve hayvanlardan kan emerler. Endofilik (kapalı alanlarda faal olan) türler ise, ahır, ev, boş depo gibi korunaklı yerleri seçer. Sivrisineklerin dinlenme yer seçimini, sıcaklık, nem, güneş ışığı, rüzgâr gibi değişkenler belirler. Sivrisinekler, beslenme şartları uygun olduğu sürece üreme alanlarından fazla uzaklaşmadan kan emebilir; uygun dinlenme yer seçimi için uzun mesafeler kat edebilirler. Sivrisinek populasyonundaki hareketler, sıcaklık, nem, üreme alanı, konukçu, sivrisineğin

fizyolojik durumu vb. değişkenlere bağlıdır. Ovaryumları tamamen gelişen hamile dişiler, üreme alanlarına doğru uçuş aktivitelerini arttırır (Bedir, 2008).

Biyotik ve abiyotik şartlar uygun olduğu zaman, ergin sivrisinekler 15 gün ile 6 ay (tropik bölgelerde) arasında bir ömür uzunluğuna sahiptir. Erkek bireylerde ömür uzunluğu, dişi bireylere göre daha kısadır (Aldemir, 2003).

Sivrisinekler çok sıcak ve kurak zamanlarda vücutlarından çok fazla sıvı kaybeder. Beslenme faaliyetleri yavaşlar ve uyuşukluk başlar. Bu olaya, yaz uyuşukluğu (estivasyon) denir. Uygun koşullar tekrar oluştuğu zaman estivasyon durumu son bulur (Aldemir, 2003).

Dişi sivrisineklerin yumurta bırakabilmeleri için enerji sağlayabilecekleri bir besine ihtiyaçları vardır. Bu ihtiyacı karşılamak için kan emmeleri gerekir. Ayrıca, sivrisinekler en az bir kere kan emmeden patojen hale gelemezler. Hastalığın aktarılması için ise en az bir yumurtlama döngüsünün tamamlanması ve tekrar kan emilmesi şarttır (Bentley, 1989). Erkek sivrisinekler ise ihtiyaçları olan enerjiyi bitki öz sularından alır (Clements, 1963; Yuval, 1992). Kan, genellikle memeli hayvanlar ve kuşlardan emilir. Birkaç sivrisinek türü düzenli olarak kurbağa ya da sürüngenler üzerinden beslenir (batrokofil). Bazı türler de hem kuşlardan (ornitofil) hem de memeli hayvanlardan kan emer (Aldemir, 2003).

Hayvanlardan kan emen sivrisineklere hayvancıl (zoofil); insanlardan kan emenlere (antropofil), konak ayrımı yapmadan hayvanlardan ve insandan kan emenlere ise hayvancıl-insancıl (zoo-antropofil) denir (Merdivenci, 1984).

1.2. Sivrisineklerin Taksonomisi

Diptera takımına bağlı Nematocera alt takımında, Chaoboridae, Dixidae ve Culicidae aileleri bulunmaktadır. Sivrisinekler, bunlardan Culicidae ailesinde yer almakta ve sadece bu ailedekilerde kan emme özelliği görülmektedir (Kettle, 1995). Culicidae ailesi, dünyanın ılıman ve tropik bölgelerinde ve Arktik Çemberin çok ötesinde var olan geniş ve bol bir gruptur. Culicidae ailesi iki alt aile ve 113 cins olarak sınıflandırılmış 3565 türü içerir. Anophelinae alt familyası üç cinse ve Culicinae alt familyası, 11 kabileye ayrılmış 110 cinse sahiptir (URL-1).

Culicidae erişkinlerinde öne doğru eğimli uzun bir hortum vardır. Hortum, baş ve gövdenin toplam uzunluğuna eşit uzunluktadır. Kanat damarları üzeri pullarla kaplıdır. Pullar kanat saçağını oluşturur. Subkostal damar dallara ayrılmadan kosta

ve radius damarlarına paralel seyreder. Culicidae larvaları akuatiktir. Çok az bir kısmı predatördür (Kettle, 1995).

Knight ve Stone (1977) ve Knight (1978), Culicidae ailesi içinde 3000'in üzerinde türün varlığını bildirmişlerdir. Ward (1984, 1992) ve Gaffigan ve Ward (1985) tarafından 203 yeni tür daha bu listeye eklemiştir. Yapılan çalışmalar ile Culicidae ailesinde toplam 3268 tür bulunduğu bildirilmiştir (Ward, 1992).

Yapılan güncel değişiklikler sonucunda, Culicidae ailesinin alt cins düzeyinde sistematik sıralaması aşağıdaki listede verilmiştir (Reinert, 2001).

Aile: Culicidae

1.Alt aile: Anophelinae

1.Cins: *Anopheles*

Alt cinsler: *Anopheles, Cellia, Kerteszia, Nyssorhynchus*

2.Cins: *Chagasia*

2.Alt aile: Culicinae

1.Tribus: Aedeomyiini

Cins: *Aedomyia*

Alt cinsler: *Aedeomyia, Lepiothauma*

2.Tribus: Aedini

1.Cins: *Aedes*

Alt cinsler: *Aedes, Aedimorphus, Alanstonea, Albuginosus, Belkinius, Bothaella, Cancraedes, Christophersiomyia, Diceromyia, Edwardsaedes, Fredwardsius, Huaedes, Indusius, Isoaedes, Leptosomatomyia, Lorrainea, Neomelaniconion, Paraedes, Pseudarmigeres, Scutomyia, Skusea, Stegomyia*

2.Cins: *Armigeres*

Alt cinsler: *Armigeres, Leicesteria*

3.Cins: *Ayurakitia*

4.Cins: *Eretmapodites*

5.Cins: *Haemagogus*

Alt cinsler: *Conopostegus, Haemagogus*

6.Cins: *Heizmannia*

Alt cinsler: *Heizmannia, Mattinglyia*

7.Cins: *Ochlerotatus*

1.Seksiyon Alt Cinsler: *Chaetocruiomyia, Finlaya, Geoskusea, Halaedes, Kenknightia, Levua, Macleaya, Molpemyia, Mucidus, Nothoskusea, Ochlerotatus, Protomacleaya, Pseudoskusea, Rhinoskusea, Rusticoidus, Zavortinkius*

2.Seksiyon Alt Cinsler: *Abraedes, Aztecaedes, Gymnometopa,*

Howardina,Kompia

8.Cins: *Opifex*

9.Cins: *Psorophora*

Alt cinsler: *Grabhamia, Janthinosoma, Psorophora*

10. Cins: *Udaya*

11.Cins: *Verrallina*

Alt cinsler: *Harbachius, Neomacleaya, Verrallina*

12.Cins: *Zeugnomyia*

3.Tribus: Culicini

1.Cins: *Culex*

Alt cinsler: *Acalleomyia, Acallyntrum, Aedinus, Afroculex, Allimanta, Anoedioporpa, Barraudius, Belkinomyia, Carrollia, Culex, Culiciomyia, Deinocerites, Eumelanomyia, Kitzmilleria, Lasiosiphon, Lophoceraomyia, Lutzia, Maillotia,*

Melanoconion, Micraedes, Microculex, Neoculex, Phenacomyia, Thaiomyia, Tinolestes

2.Cins: *Galindomyia*

4.Tribus: Culisetini

Cins: *Culiseta*

Alt cinsler: *Allotheobaldia, Austrotheobaldia, Climacura, Culicella, Culiseta, Neotheobaldia, Theomyia*

5.Tribus: Ficalbiini

1.Cins: *Ficalbia*

2.Cins: *Mimomyia*

Alt cinsler: *Etorleptiomyia, Ingramia, Mimomyia*

6.Tribus: Hodgesiini

Cins: *Hodgesia*

7.Tribus: Mansoniini

1.Cins: *Coquillettidia*

Alt cinsler: *Austromansonia, Coquillettidia, Rhynchotaenia*

2.Cins: *Mansonia*

Alt cinsler: *Mansonia, Mansonioides*

8. Tribus: Orthopodomyiini

Cins: *Orthopodomyia*

9.Tribus: Sabethini

1.Cins: *Isostomyia*

2.Cins: *Johnbelkinia*

3.Cins: *Limatus*

4.Cins: *Malaya*

5.Cins: *Maorigoeldia*

6.Cins: *Onirion*

7.Cins: *Runchomyia*

Alt cinsler: *Ctenogoeldia, Runchomyia*

8.Cins: *Sabethes*

Alt cinsler: *Davismyia, Peytonulus, Sabethes, Sabethinus*, *Sabethoides*

9.Cins: *Shannoniana*

10.Cins: *Topomyia*

Alt cinsler: *Suaymyia, Topomyia*

11.Cins: *Trichoprosopon*

12.Cins: *Tripteroides*

Alt cinsler: *Polylepidomyia, Rachionotomyia, Rachisoura, Tricholeptomyia, Tripteroides*

13.Cins: *Wyeomyia*

Alt cinsler: *Antunesmyia, Caenomyiella, Cruzmyia, Decamyia, Dendromyia, Dodecamyia, Exallomyia, Menolepis, Nunezia, Phoniomyia, Prosopolepis, Wyeomyia, Zinzala*

10.Tribus: Uranotaeniini

Cins: *Uranotaenia*

Alt cinsler: *Pseudoficalbia, Uranotaenia*

11.Tribus: Toxorhynchitini

Cins: *Toxorhynchites*

Alt cinsler: *Afrorhynchus, Ankylorhynchus, Lynchiella, Toxorhynchites*

1.3. Moleküler Tanımlama

Sivrisineklerin moleküler olarak tanımlanma yöntemleri, kardeş türlerin tanımlanmasını sağlamak için geliştirilmiş olmasına rağmen, daha sonraları birçok sivrisinek türünün tanımlanması için kullanılmıştır. Sivrisineklerin tür tanımlamalarının yapılmasının yanı sıra, popülasyon yapısını ve dinamiğini belirlemek için pek çok moleküler teknik kullanılmaktadır (ECDC, 2014).

Sivrisineklerin türüne veya evresine göre kullanılabilecek moleküler teknikler bulunmaktadır. Bunlar arasında mitokondrial ve ribosomal DNA bölgeleri için en fazla kullanılan teknik, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemidir. Bu yöntem ile çoğaltılan gen ürününün sekans analizi yapıldıktan sonra, GenBank ve BOLD Systems gibi açık erişimli veritabanlarında eşleşen sekans verisi bulunursa, örneğin tanımlanması yapılabilmektedir (ECDC, 2014).

1.3.1. DNA barkodlama

Araştırmacılar; sadece genomdaki standart bir bölgeyi temsil eden kısa bir DNA dizisini kullanarak türlerin kolaylıkla ve hızlı bir şekilde tanımlanabileceğini savunmuşlar ve bu özel bölgeyi de DNA barkodu olarak isimlendirmişlerdir (ECDC, 2014; Hebert ve diğ., 2003). DNA barkodlama kısa, standart bir gen bölgesinin, her türün kendisine özgü bir tür içi etiketi olacak şekilde kullanılarak hızlı, doğru ve otomatik bir şekilde tür tanımlaması yapılabilen spesifik bir sistemdir (ECDC, 2014; Keskin ve Atar, 2013). Bu amaçla karşılaştırılabilir olması nedeniyle mitokondriyal genomdaki sitokrom c oksidaz alt ünite I (COI) geninin bir bölümü seçilmektedir. Elde edilen DNA dizi verileri GenBank (BLAST) veya BOLD veri bankalarında yer alan DNA dizileri ile karşılaştırılabilmektedir (ECDC, 2014; Laboudi ve diğ., 2011).

Genomik DNA'da bulunan rDNA bölgeleri birçok gen yapısının art arda sıralanması şeklinde oluşur. Internal Transcribed Spacer (ITS) bölgeleri ise DNA üzerinde birbirinin ardı sıra gelen rDNA tekrarlarına yerleşmiştir ve korunmuş bölgelerin birbirinden ayrılmasını sağlayan iki kısmı temsil etmektedirler. Türlere ait ITS dizileri birbirinden ayrı popülasyonlar arasındaki akrabalık ilişkilerinin araştırılmasında yararlı veriler sunmaktadır (Baldwin ve diğ., 1995). ITS1 gen bölgesi, 18S ve 5.8S rDNA arasına yerleşmiş iken, ITS2 gen bölgesi 5.8S ve 28S rDNA arasına

yerleşmiştir. Bu bölgeler, korunmuş rDNA gen bölgelerine göre daha fazla değişkenlik göstermektedirler. ITS1 bölgesi, ITS2 gen bölgesinden daha çok değişiklik gösterdiği için filogenetik çalışmalarda ilişkilerin incelenmesi açısından daha fazla çözüm olanağı sunmaktadır. Özellikle bitkiler ile yapılan çalışmalarda ITS bölgeleri genetik sürüklenmelere yönelik oldukça etkili veriler sunarken, farklı seviyelerdeki filogenetik çalışmalarda kullanışlı olduğu görülmektedir (Baldwin ve diğ., 1992; Baldwin ve diğ., 1998). Bu çalışmalardan elde edilen DNA dizileri de BOLD veya GenBank (BLAST) veri bankalarındaki DNA dizileriyle karşılaştırılabilmektedir (ECDC, 2014).

2. MATERYAL METOD

2.1. Örneklerin Toplanması

Çalışmada ergin sivrisinekler kullanıldı. Sivrisinekler Haziran 2017-Eylül 2018 tarihleri arasında ışık tuzakları yoluyla ve manuel olarak toplandı. Tablo 2.1'de de görüleceği üzere sivrisineklerin bulunduğu koordinatlar ve toplanma tarihleri kaydedildi. 54 adet toplanan sivrisinek DNA izolasyonu yapılıncaya kadar %70'lik etil alkol içerisinde -20^{o}C 'de muhafaza edildi.

Tablo 2.1. Sivrisinek örneklerine ait NCBI erişim numaraları, alındığı koordinatlar ve tarih bilgileri

Tür	NCBI	Bulunan Koordinat	Toplanma Tarihi
S1=*Ae. geniculatus*	MH392201	40.656733,30.146763	6.06.2017
S2=*Ae. geniculatus*	MH392202	40.656733,30.146763	6.06.2017
S3=*Cx. pipiens complex sp.*	MH463070	40.799133,29.957559	26.06.2017
S4=*Ae. geniculatus*	MH392203	40.656733,30.146763	27.06.2017
S5=*Ae. geniculatus*	MH392204	40.656733,30.146763	27.06.2017
S6=*Ae. geniculatus*	MH392205	40.656733,30.146763	27.06.2017
S7=*Ae. geniculatus*	MH463069	40.656733,30.146763	27.06.2017
S9=*An. plumbeus*	MH463068	40.847406,30.024063	29.06.2017
S10=*Cx. pipiens complex sp.*	MK713980	40.799133,29.957559	2.07.2017
S11=*Cx. pipiens complex sp.*	MH463067	40.640525,29.938661	5.07.2017
S13=*Cx. pipiens complex sp.*	MH463066	40.847406,30.024063	5.07.2017
S14=*Cx. pipiens complex sp.*	MH463065	40.799003,29.957548	12.07.2017

Tablo 2.1. (Devam) Sivrisinek örneklerine ait NCBI erişim numaraları, alındığı koordinatlar ve tarih bilgileri

Tür	NCBI	Bulunan Koordinat	Toplanma Tarihi
S15=*Cx. pipiens complex sp.*	MH463071	40.799003,29.957548	12.07.2017
S16=*Cx. pipiens complex sp.*	MH463059	40.799003,29.957548	12.07.2017
S17=*Cx. pipiens complex sp.*	MH463064	40.799003,29.957548	12.07.2017
S18=*Cx. pipiens complex sp.*	MH463072	40.640383,29.938674	20.07.2017
S19=*An. funestus*	MH463063	40.640383,29.938674	20.07.2017
S25=*Cx. torrentium*	MH463062	40.822020,29.924783	10.11.2017
S26=*Cx. pipiens complex sp.*	MH463073	40.798924,29.957528	11.11.2017
S28=*Cx. pipiens complex sp.*	MH463061	40.822020,29.924783	14.11.2017
S29=*Cx. pipiens complex sp.*	MH463060	40.822015,29.924773	24.11.2017
S30= *Cx. pipiens complex sp.*	MK713981	40.798894,29.957620	12.06.2018
S31= *Cx. pipiens complex sp.*	MK713982	40.798894,29.957620	12.06.2018
S32= *Cx. pipiens complex sp.*	MK713983	40.798894,29.957620	12.06.2018
S34= *Cs. longiareolata*	MK713984	40.798612,29.956443	13.06.2018
S35= *Cx. pipiens complex sp.*	MK713985	40.798612,29.956443	13.06.2018
S36= *Cx. pipiens complex sp.*	MK713986	40.798612,29.956443	13.06.2018
S38= *Cx. pipiens complex sp.*	MK713987	40.799186,29.957860	18.06.2018
S39= *Cx. pipiens complex sp.*	MK713988	40.760071,29.928734	20.06.2018
S40= *Cx. pipiens complex sp.*	MK713989	40.800059,29.956035	9.07.2018
S41= *Cx. pipiens complex sp.*	MK713990	40.847473,30.024448	12.07.2018

Tablo 2.1. (Devam) Sivrisinek örneklerine ait NCBI erişim numaraları, alındığı koordinatlar ve tarih bilgileri

Tür	NCBI	Bulunan Koordinat	Toplanma Tarihi
S42= *Ae. albopictus*	MK713991	40.799147,29.957824	7.09.2018
S43= *Cx. pipiens complex sp.*	MK713992	40.847473,30.024448	12.07.2018
S44= *Cx. pipiens complex sp.*	MK713993	40.847473,30.024448	12.07.2018
S45= *Cx. pipiens complex sp.*	MK713994	40.847473,30.024448	12.07.2018
S46= *Cx. pipiens complex sp.*	MK713995	40.832168,29.911503	14.07.2018
S47= *Cx. pipiens complex sp.*	MK713996	40.832168,29.911503	14.07.2018
S52= *Ae. geniculatus*	MK713997	40.656733,30.146763	18.07.2018
S53= *Ae. geniculatus*	MK713998	40.798966,29.957656	19.07.2018
S54= *Ae. geniculatus*	MK713999	40.682336,30.136046	20.07.2018
S55= *Ae. geniculatus*	MK714000	40.682336,30.136046	20.07.2018
S56= *Cx. pipiens complex sp.*	MK714001	40.834515,29.903672	20.07.2018
S57= *Cx. pipiens complex sp.*	MK714002	40.834515,29.903672	20.07.2018
S58= *Ae. albopictus*	MK714003	40.799280,29.957796	21.07.2018
S59= *Cx. pipiens complex sp.*	MK714004	40.763641,29.931040	8.08.2018
S60= *Cx. pipiens complex sp.*	MK714005	40.763641,29.931040	8.08.2018
S61= *Ae. albopictus*	MK714006	40.639651,29.938547	11.08.2018
S62= *Ae. albopictus*	MK714007	40.639618,29.938382	12.08.2018
S63= *Ae. albopictus*	MK714008	40.771936,29.816591	15.08.2018
S64= *Ae. albopictus*	MK714009	40.771936,29.816591	15.08.2018

Tablo 2.1. (Devam) Sivrisinek örneklerine ait NCBI erişim numaraları, alındığı koordinatlar ve tarih bilgileri

Tür	NCBI	Bulunan Koordinat	Toplanma Tarihi
S65= *Ae. albopictus*	MK714010	40.771936,29.816591	15.08.2018
S66= *Cx. pipiens complex sp.*	MK714011	40.771936,29.816591	15.08.2018
S67= *Cx. pipiens complex sp.*	MK714012	40.771936,29.816591	15.08.2018
S68= *Cx. pipiens complex sp.*	MK714013	40.771936,29.816591	15.08.2018

2.2. DNA İzolasyonu

Alkolü uzaklaştırılan sivrisinekler DNA izolasyonu için MACHEREY-NAGEL marka (Genomic DNA from insects, NucleoSpin DNA Insect, Katalog numarası 740470.50) DNA izolasyon kitinde önerilen protokol modifiye edilerek uygulandı. Buna göre sırasıyla aşağıdaki işlemler yapıldı.

İnkübatörde 37°C'de sivrisineklerden alkol uzaklaştırıldı. B5 tamponuna 24 ml %99'luk etanol eklendi. NucleoSpin Bead Tüpüne yaklaşık 40 mg sivrisinek konuldu. Üzerine 100 µl Elution Buffer BE eklendi. 40 µl Buffer MG eklendi. Nakış makasının ucu her işlemde ateş ile steril hale getirilerek tüp içerisindeki örnekler iyice parçalandı. 20 µl sıvı Proteinase K eklendi. 5 saniye vortexlendi. 37°C'de inkübatörde gece boyu bekletildi. Arada bir altüst edildi. Örnekler 11.000 x g'de 60 saniye santrifüj edildi. 600 µl Buffer MG eklendi. 3 saniye vortex ile karıştırıldı. Tekrar 11,000 x g'de 60 saniye santrifüj edildi. ~500-600 µl elde edilen süpernatant, her biri 2 ml'lik biriktirme tüpü içerisinde bulunan NucleoSpin DNA Insect Kolon tüpüne transfer edildi. 11,000 x g'de 60 saniye santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra içlerinde süzüntü bulunan biriktirme tüpleri atılarak her bir kolon yeni biriktirme tüplerine yerleştirildi. Birinci yıkama işlemi için 500 µl BW tamponu eklenerek 11,000 x g'de 60 saniye santrifüj edildi. Alta geçen süzüntü atıldı ve kolon tekrar biriktirme tüpüne yerleştirildi. İkinci yıkama işlemi için 500 µl B5 tamponu kolona eklendi, 11,000 x g'de 60 saniye santrifüj edildi. Alta geçen süzüntü atıldı ve kolon tekrar biriktirme tüpüne yerleştirildi. Hiçbir tampon çözelti eklenmeden tekrar 11,000 x g'de 60 saniye santrifüj edildi ve tampon çözeltiler silika membrandan iyice uzaklaştırılarak silika membran kurutuldu. NucleoSpin DNA Insect Kolon tüpü 1,5 ml'lik steril eppendorf tüpüne yerleştirildi. Kolona 100 µl BE tamponu eklendi ve oda

sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. 11,000 x g'de 60 saniye santrifüj edilerek genomik DNA'nın kolondan eppendorf tüpüne geçmesi sağlandı.

2.3. DNA Konsantrasyonunun Ölçümü

Örneklerin konsantrasyonunun ölçümü Qubit 2.0 Fluorometer kiti (Invitrogen, Amerika) kullanılarak gerçekleştirildi. Standart okutmasında, standartların kendisi de birer örnek olarak ele alındı. 54 adet örneğimize 2 adet standartlar da eklendi. Her bir örnek için 199 ul Buffer ve 1 ul Reagent konulan bir tüp hazırlanıp vortekslendi (56 x 199ul Buffer + 56 x 1 ul Reagent). Örnek sayısı kadar 1 ml'lik tüpler hazırlandı. Standartlar için olan 1 ml'lik tüplerin her birine, hazırlanan karışımdan 190 µl; DNA konsantrasyonu ölçülecek örnekler için olan 1 ml'lik tüplerin her birine, hazırlanan karışımdan 195 µl kondu. Birinci standart olacak olan 1 ml'lik tüpe ilk standarttan 10 µl eklenip vortekslendi. İkinci standart olacak olan 1 ml'lik tüpe de ikinci standarttan 10 µl eklenip vortekslendi. DNA bulunan tüplerden de DNA konsantrasyonu ölçülecek olan 1 ml'lik tüplere 5'er µl aktarılıp vortekslendi. Dokunmatik olan Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Amerika) cihazının ekranına tıklandı ve dsDNA HS (High Sensitivity) seçildi. İlk standart 1 dakika bekletildikten sonra , cihazdaki kuyucuğa yerleştirilip Read yazısına tıklandı. Okuması bittikten sonra ilk standart kuyucuktan çıkarıldı ve yerine 1 dakika bekletilmiş olan ikinci standart yerleştirilip aynı şekilde Read yazısına tıklandı. Okuması bittikten sonra ikinci standart da kuyucuktan çıkarıldı. DNA konsantrasyonu ölçülecek olan örneğin olduğu 1 ml'lik ilk tüp 1 dakika bekletildikten sonra kuyucuğa yerleştirildi ve Read yazısına tıklanarak örnek okutuldu. Calculate Stock Concentration yazısına tıklandı. Çıkan ekranda ölçümü yapılan örneğin kaç ul olduğu girildi ve Stock Concentration oranı ng/ul olarak belirlendi. Çıkan sonuç kaydedildi. Sonra 1 dakika bekletilmiş olan ikinci örnek kuyucuğa yerleştirildi ve Read Next Sample yazısına tıklanarak ikinci örnek okutuldu. Aynı işlem bütün örnekler için tekrar edildi.

2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

İzole edilen DNA'lardan mitokondrial COI (Ortman ve diğ., 2010) ve ITS2 (Koosha ve diğ., 2017) bölgelerine ait primerler kullanılarak PZR yapıldı. PZR koşulları ve kullanılan primerler Tablo 2.2, Tablo 2.3, Tablo 2.4 ve Tablo 2.5'de görülmektedir. PZR reaksiyon karışımı hazırlamak için 5x FIREPol Master Mix (Solis BioDyne) kullanıldı. Firma tarafından tavsiye edilen PZR reaksiyon karışımı şu şekilde oluşturuldu.

COI için;

5x Master Mix: 6µl

10 µM primer (sense): 0,5 µl

10 µM primer (antisense): 0,5 µl

Kalıp DNA: 1 µl

Saf su: Her bir gen bölgesine ait PZR karışımı için 30 µl'ye tamamlandı.

ITS2 için;

5x Master Mix: 6µl

10 µM primer (sense): 0,5 µl

10 µM primer (antisense): 0,5 µl

Kalıp DNA: 2 µl

Saf su: Her bir gen bölgesine ait PZR karışımı için 30 µl'ye tamamlandı.

2.4.1. COI Gen bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu

PZR, Tablo 2.2'de görülen COI gen bölgesine ait evrensel primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Ortman ve diğ., 2010).

Tablo 2.2. Mitokondriyal COI bölgesinin PZR işlemlerinde kullanılan ileri ve geri primerler

Primer Bölgesi	Primer Yönü	Primer Dizisi
COI	İleri	5′-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3′
	Geri	5′-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3′

Tablo 2.3. Mitokondriyal COI bölgesine ait PZR koşulları

PZR Aşaması	Sıcaklık (ºC)	Süre (saniye)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94	300	1
Denatürasyon	95	60	35
Bağlanma	55	60	
Uzama	72	60	
Son Uzama	72	420	1
Saklama	4		

2.4.2. ITS2 Gen bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu

PZR, Tablo 2.4'de görülen 5.8S rDNA-ITS2-28S rDNA gen bölgesine ait primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Koosha ve diğ., 2017).

Tablo 2.4. Mitokondriyal ITS2 bölgesinin PZR işlemlerinde kullanılan ileri ve geri primerler

Primer Bölgesi	Primer Yönü	Primer Dizisi
5.8S rDNA	İleri	5′- TGTGAACTGCAGGACACATGAA-3′
28S rDNA	Geri	5′- ATGCTTAAATTTAGGGGGTAGTC-3′

Tablo 2.5. Mitokondriyal ITS2 bölgesine ait PZR koşulları.

PZR Aşaması	Sıcaklık (ºC)	Süre (saniye)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	240	1
Denatürasyon	94	60	
Bağlanma	57	60	32
Uzama	72	60	
Son Uzama	72	600	1
Saklama	4		

2.5. Agaroz Jel Elektroforezi

1 gr Agaroz ve 100 ml 1xTAE erlenmayer içerisinde karıştırılıp mikrodalga fırında homojen hale gelene kadar ısıtıldı. Hafif soğuması beklenerek 7 µl Red Safe (Etidyum Bromid'e alternatif) eklendi. Hazırlanmış olan bu karışım elektroforez kasetine döküldü ve taraklar yerleştirilerek polimerize olana kadar bekletildi. Tarakların oluşturduğu kuyucuklara, elde ettiğimiz PZR ürünlerinden 4'er µl; 50 baz çifti ve 100 baz çifti uzunluğunda Marker'lardan 3'er µl konuldu. 100 Volt'ta 45 dakika yürütüldü.

2.6. DNA Dizi Analizi

PZR ürünleri ExoSAP-IT^{TM} PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) kiti prosedürleri kullanılarak BM lab tarafından saflaştırıldı. Dizi analizi Macrogen Hollanda laboratuvarında, ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti kullanılarak yapıldı. Dizi analizi işlemi COI için, saflaştırılan PZR ürünleri COI'e ait ileri ve geri primerler ile; ITS2 için, saflaştırılan PZR ürünleri ITS2'ye ait ileri ve geri primerler kullanılarak yapıldı.

2.7. Filogenetik Analiz

DNA sekansları, Chromas (Version: 2.6.5) programı kullanılarak görüntülendi ve diziler Chromas üzerinden ayrı ayrı FASTA formatında kaydedildi. Dizilerin ileri ve geri komplement okumaları ClustalW programı (URL-2) ile hizalanarak karşılaştırıldı. Her bir sivrisinek türü için COI gen bölgesine ait olan diziler FASTA formatında NCBI Nucleotide BLAST'a yüklendi (URL-3). NCBI veri bankasında kayıtlı dizilerle benzerlikleri karşılaştırıldı. Daha sonra aynı işlem her bir *Culex* türü için ITS2 gen bölgesine ait olan diziler için tekrar yapıldı. En çok benzerlik gösteren diziler, benzerlik sıralarına göre GeneBank erişim numaraları ile birlikte filogenetik ağaçta kullanılmak üzere not edildiler (Tablo 2.6 ve Tablo 2.7). Çalışmamıza ait diziler ve NCBI Nucleotide'den elde edilen sivrisinek türlerine ait COI ve ITS2 gen dizileri MEGA X (Kumar ve diğ., 2018) programına yüklenerek modelleme yöntemleri, genetik uzaklık matrisleri, nükleotid kompozisyonları, nükleotid çifti frekansları, substitüsyon matrisleri belirlendi.

Maksimum Likelihood metodu, Tamura-Nei Modeli (Tamura ve Nei, 1993), Bootstrap 1000'de filogenetik ağaçları oluşturuldu.

Tablo 2.6. COI geni için filogenetik ağaçlarda kullanılmak üzere NCBI'dan elde edilen çeşitli sivrisinek türlerine ait erişim numaraları

Türler	**Erişim Numaraları**
Ae. geniculatus	KM258304.1
Ae. Japonicus	FJ641869.1
Ae. notoscriptus	MG242508.1
Ae. albopictus	MH817529.1
An. funestus	MK300231.1
An. funestus	MK300232.1
An. funestus	KJ522832.1
An. funestus	MH299888.1
An. eiseni	MF172271.1
An. darlingi	JF923693.1
An. annulipes	MG712534.1
An. plumbeus	KM258215.1
Cx. pipiens	KM258167.1
Cx. quinquefasciatus	KF407473.1
Cx. pipiens molestus	FN395171.1
Cx. torrentium	KJ401313.1
Cx. pipiens pallens	KC407754.1
Cx. hortensis	KJ012068.1
Cx. theileri	KJ012174.1

Tablo 2.7. ITS2 geni için filogenetik ağaçlarda kullanılmak üzere NCBI'dan elde edilen çeşitli sivrisinek türlerine ait erişim numaraları

Türler	**Erişim Numaraları**
Cx. pipiens	U22116.1
Cx. quinquefasciatus	HQ848572.1
Cx. torrentium	AJ850083.1
Cx.australicus	KU495639.1
Cx. pipiens molestus	EF539853.1

3. BULGULAR

Çalışmamıza ait sivrisisinek örneklerinin evrimsel ilişkilerinin hesaplanması ve filogenetik ağacın oluşturulmasında ML metodu, türler arası genetik uzaklıklarının belirlenmesinde Tamura-Nei Modeli, ağacın güvenilirliğini sağlamak için ise 1000 tekrarlı Bootsrap testi kullanıldı (Felsenstein, 1985; Tamura ve Nei, 1993; Kumar ve diğ., 2018).

3.1. *Aedes geniculatus*

Toplam 10 örneğe ait COI gen dizisi analizi gerçekleştirildi ve dış gruplar ile beraber genetik farklılıklar ortaya konuldu. Örneklerimize ait G-C oranlarına bakıldığında (Tablo 3.1) *Ae. geniculatus*'a ait değerlerin %31,2-%32,3 arasında değişkenlik gösterdiği saptandı. Dış gruplarla birlikte düşünüldüğünde ortalama G-C oranı %31,6 olarak belirlendi (Tamura, 1992; Kumar ve diğ., 2018).

S1, S2, S4, S5, S6, S7, S52, S53, S54, S55 örneklerimiz ve *Ae. geniculatus* (KM258304.1) göz önüne alındığında 632 baz çiftlik bölgede 24 nükleotidde değişiklik olduğu (%3,79) bütün örnekler birlikte incelendiğinde ise 632'de 108 nükleotitte değişiklik olduğu (%17,08) görüldü. Transisyon/Transversiyon oranları (R), Parsimoni Anlamlı Bölgeler, Singleton Bölgeleri Tablo 3.2'de gösterildi (Tamura, 1992; Kumar ve diğ., 2018).

Tablo 3.1. *Ae. geniculatus* COI gen bölgesine ait nükleotid kompozisyonu (%)

Sivrisinek Örneği	T	C	A	G	A-T	G-C
S1 *Ae. geniculatus* (MH392201)	39,1	15,0	29,6	16,3	68,7	31,3
S2 *Ae. geniculatus* (MH392202)	38,8	15,2	29,7	16,3	68,5	31,5
S4 *Ae. geniculatus* (MH392203)	38,6	15,3	29,6	16,5	68,2	31,8
S5 *Ae. geniculatus* (MH392204)	38,9	15,0	29,7	16,3	68,7	31,3
S6 *Ae. geniculatus* (MH392205)	38,8	15,2	29,7	16,3	68,5	31,5
S7 *Ae. geniculatus* (MH463069)	38,6	15,5	29,6	16,3	68,2	31,8
S52 *Ae. geniculatus* (MK713997)	38,8	15,2	29,9	16,1	68,7	31,3
S53 *Ae. geniculatus* (MK713998)	39,2	15,2	29,6	16,0	68,8	31,2
S54 *Ae. geniculatus* (MK713999)	38,6	15,3	29,4	16,6	68,0	32,0
S55 *Ae. geniculatus* (MK714000)	38,6	15,5	29,4	16,5	68,0	32,0
KM258304.1 *Ae. geniculatus*	38,8	15,2	29,7	16,3	68,5	31,5
FJ641869.1 *Ae. japonicus*	38,9	16,1	28,8	16,1	67,7	32,3
MG242508.1 *Ae. notoscriptus*	39,1	16,0	29,7	15,2	68,8	31,2
Ortalama	38,8	15,4	29,6	16,2	68,4	31,6

Tablo 3.2. *Ae. geniculatus* COI gen bölgesi için nükleotid çifti frekansları

	Ae. geniculatus	**Bütün Örnekler (Tablo 3.1)**
Korunmuş Bölge	608/632 (%96,20)	524/632 (%82,9)
Değişken Bölge	24/632 (%3,79)	108/632 (%17,08)
Parsimoni Anlamlı Bölge	3/632 (%0,5)	40/632 (%6,32)
Singleton Bölgeler	21/632 (%3,32)	68/632 (%10,75)
Eş Çiftler(ii)	626	607
Transisyonel Çiftler(si)	3	11
Transversiyonel Çiftler(sv)	3	13
R(si/sv)	0,94	0,8

Substitüsyon oranlarının maximum likelihood yöntemiyle belirlenmesinde Tamura 3-parameter modeli kullanılmdı (Tablo 3.3). Substitüsyon oranları bir bazdan diğerine substitüsyon geçiş ihtimalini temsil etmektedir. Transisyonel substitüsyon oranları A/G ve T/C için 8,42; C/T ve G/A için ise 18,23 olarak hesaplandı. Transversiyonel oranlar Tablo 3.3'te verildi. Bu sonuçlar ışığında hesaplanan transisyon/transversiyon oranı (R) 1,17 olarak hesaplandı. Hesaplamaların yapılmasında kullanılan nükleotid frekansları A ve T için %34,22; G ve C için %15,78'dir (Tamura, 1992; Kumar ve diğ., 2018).

Tablo 3.3. *Ae. geniculatus* COI geni için Substitüsyon matrisi

	A	T	C	G
A	-	7,99	3,69	**8,42**
T	7,99	-	**8,42**	3,69
C	7,99	**18,23**	-	3,69
G	**18,23**	7,99	3,69	-

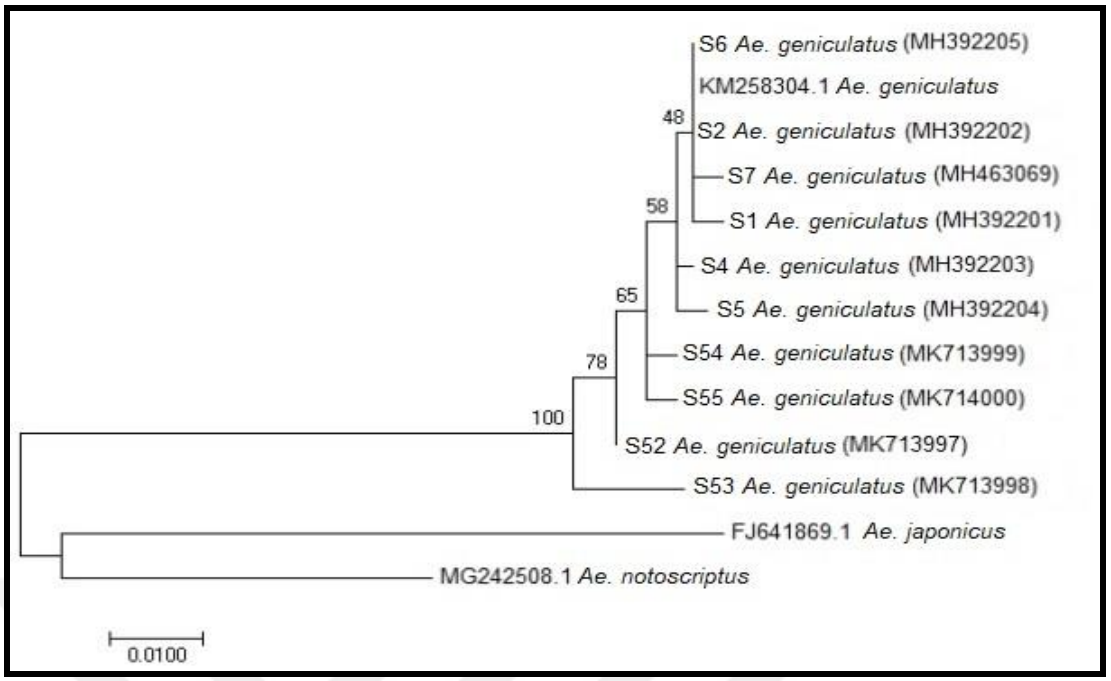
Pairwise genetik uzaklık matrisi Tamura 3-parameter modeline göre oluşturuldu. *Aedes* cinsine ait sivrisinekler arasındaki ortalama genetik uzaklık 0,017 (%1,7) olarak bulundu. *Ae. geniculatus* türüne ait en düşük genetik uzaklık 0,002, en yüksek genetik uzaklık ise 0,017 (%1,7) olarak bulundu. Bu sonuçlar aynı türü temsil eden bireyler arasında görülecek varyasyon düşünüldüğünde normal değerlerdir. Genetik uzaklık sonuçları, 13 sivrisinek örneğinin dizilerinin pairwise analizlerine göre hesaplandı ve standart hatalarının hesaplanmasında 1000 tekrarlı bootstrap testlerinden faydalanıldı (Felsenstein, 1985; Tamura ve Nei, 1993; Kumar ve diğ., 2018) (Tablo 3.4).

0,0100 ölçekte oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 3.1'de görülmektedir.

Tablo 3.4. *Ae. geniculatus* COI geni için iç ve dış gruplar arasında genetik uzaklık matrisi

S1 *Ae. geniculatus* (MH392201)		0,002	0,003	0,003	0,002	0,003	0,004	0,007	0,004	0,004	0,002	0,026	0,022
S2 *Ae. geniculatus* (MH392202)	0,002		0,002	0,002	0,000	0,002	0,003	0,006	0,003	0,003	0,000	0,027	0,023
S4 *Ae. geniculatus* (MH392203)	0,004	0,002		0,003	0,002	0,003	0,003	0,007	0,003	0,003	0,002	0,027	0,023
S5 *Ae. geniculatus* (MH392204)	0,006	0,003	0,003		0,002	0,003	0,003	0,007	0,004	0,004	0,002	0,027	0,022
S6 *Ae. geniculatus* (MH392205)	0,002	0,000	0,002	0,003		0,002	0,003	0,006	0,003	0,003	0,000	0,027	0,023
S7 *Ae. geniculatus* (MH463069)	0,004	0,002	0,004	0,006	0,002		0,003	0,007	0,004	0,004	0,002	0,027	0,023
S52 *Ae. geniculatus* (MK713997)	0,006	0,003	0,006	0,007	0,003	0,006		0,005	0,003	0,003	0,003	0,026	0,022
S53 *Ae. geniculatus* (MK713998)	0,016	0,014	0,016	0,017	0,014	0,016	0,011		0,006	0,006	0,006	0,028	0,022
S54 *Ae. geniculatus* (MK713999)	0,008	0,006	0,006	0,007	0,006	0,008	0,004	0,015		0,003	0,003	0,026	0,023
S55 *Ae. geniculatus* (MK714000)	0,008	0,006	0,006	0,007	0,006	0,008	0,004	0,015	0,004		0,003	0,027	0,023
Ae. geniculatus (KM258304.1)	0,002	0,000	0,002	0,003	0,000	0,002	0,003	0,014	0,006	0,006		0,027	0,023
Ae. japonicus (FJ641869.1)	0,092	0,095	0,097	0,093	0,095	0,096	0,092	0,099	0,093	0,095	0,095		0,022
Ae. notoscriptus (MG242508.1)	0,075	0,077	0,080	0,076	0,077	0,079	0,075	0,076	0,079	0,079	0,077	0,076	
Ortalama	0,017												

Yukarı köşegen: Türler arasındaki ikili farklılıkların standart sapması, aşağı köşegen: Türler arasındaki ikili farklılıkların ortalama sayısı.



Şekil 3.1. *Ae. geniculatus*'a ait COI gen bölgesi için ML metodu ile oluşturulan moleküler filogenetik ağaç

3.2. *Aedes albopictus*

Toplam 7 örneğe ait COI gen dizisi analizi gerçekleştirilerek dış gruplar ile aralarındaki genetik farklılıklar ortaya konuldu. Örneklerimize ait G-C oranlarına bakıldığında (Tablo 3.5) *Ae. albopictus*'a ait değerlerin %30,7-%32,5 arasında değişkenlik gösterdiği saptandı. Dış gruplarla birlikte düşünüldüğünde ortalama G-C oranı %32,3 olarak belirlendi (Tamura, 1992; Kumar ve diğ., 2018).

S42, S58, S61, S62, S63, S64, S65 örneklerimiz ve *Ae. albopictus* (MH817529.1) göz önüne alındığında 609 baz çiftlik bölgede 1 nükleotitte değişiklik olduğu (%0,16) bütün örnekler (dış gruplarla beraber) birlikte incelendiğinde ise 609'da 111 nükleotitte değişiklik olduğu (%18,22) görüldü. Transisyon/Transversiyon oranları (R), Parsimoni Anlamlı Bölgeler, Singleton Bölgeleri Tablo 3.6'da gösterildi (Tamura, 1992; Kumar ve diğ., 2018).

Tablo 3.5. COI gen bölgesine ait nükleotid kompozisyonu (%)

Sivrisinek Örneği	T	C	A	G	A-T	G-C
S42 *Ae. albopictus* (MK713991)	39,2	16,9	28,4	15,4	67,6	32,3
S58 *Ae. albopictus* (MK714003)	39,2	16,9	28,2	15,6	67,4	32,5
S61 *Ae. albopictus* (MK714006)	39,2	16,9	28,4	15,4	67,6	32,3
S62 *Ae. albopictus* (MK714007)	39,2	16,9	28,2	15,6	67,4	32,5
S63 *Ae. albopictus* (MK714008)	39,2	16,9	28,4	15,4	67,6	32,3
S64 *Ae. albopictus* (MK714009)	39,2	16,9	28,4	15,4	67,6	32,3
S65 *Ae. albopictus* (MK714010)	39,2	16,9	28,2	15,6	67,4	32,5

Tablo 3.5. (Devam) COI gen bölgesine ait nükleotid kompozisyonu (%)

Sivrisinek Örneği	T	C	A	G	A-T	G-C
Ae. albopictus (MH817529.1)	39,2	16,9	28,2	15,6	67,4	32,5
Ae. japonicus (FJ641869.1)	39,6	16,3	28,2	15,4	68,3	31,7
Ae. notoscriptus (MG242508.1)	39,6	16,3	28,2	14,4	69,3	30,7
Ortalama	39,3	16,8	28,2	15,4	67,8	32,3

Tablo 3.6. *Ae. albopictus* COI gen bölgesi için nükleotid çifti frekansları

	Ae. albopictus	**Bütün Örnekler (Tablo 3.5)**
Korunmuş Bölge	608/609 (%99,84)	498/609 (%81,77)
Değişken Bölge	1/609 (%0,16)	111/609 (%18,22)
Parsimoni Anlamlı Bölge	1/609 (%0,16)	49/609 (%8,04)
Singleton Bölgeler	0/609 (%0)	62/609 (%10,18)
Eş Çiftler(ii)	608	577
Transisyonel Çiftler(si)	1	16
Transversiyonel Çiftler(sv)	0	16
R(si/sv)	-	1

Substitüsyon oranlarının maximum likelihood yöntemiyle belirlenmesinde Tamura 3-parameter modeli kullanıldı (Tablo 3.7). Transisyonel substitüsyon oranları A/G ve T/C için 8,82; C/T ve G/A için ise 18,58 olarak hesaplandı. Transversiyonel oranlar Tablo 3.7'de verildi. Bu sonuçlar ışığında hesaplanan transisyon/transversiyon oranı (R) 1,06 olarak hesaplandı. Hesaplamaların yapılmasında kullanılan nükleotid frekansları A ve T için %33,91; G ve C için %16,09'dur (Tamura, 1992; Kumar ve diğ., 2018).

Tablo 3.7. *Ae. albopictus* COI geni için substitüsyon matrisi

	A	T	C	G
A	-	7,66	3,64	**8,82**
T	7,66	-	**8,82**	3,64
C	7,66	**18,58**	-	3,64
G	**18,58**	7,66	3,64	-

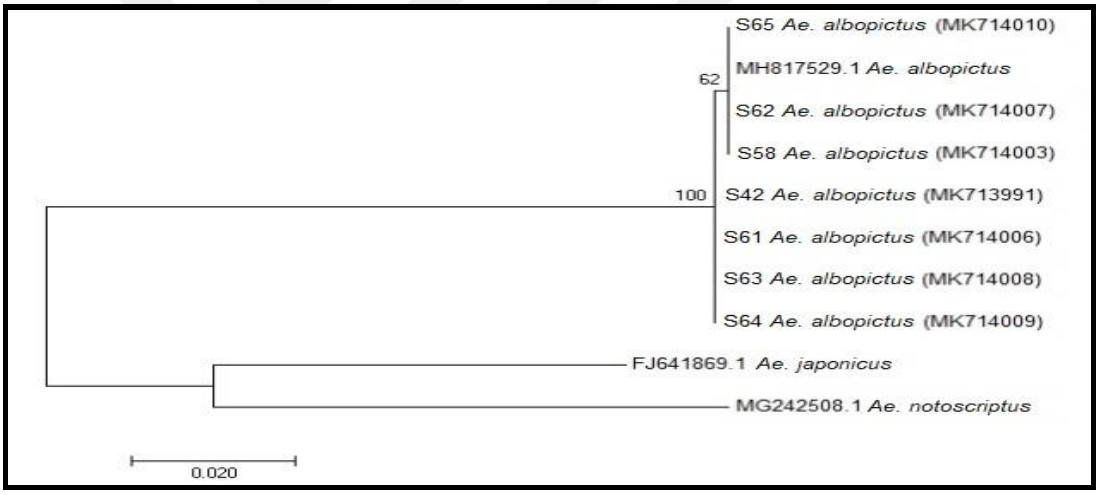
Aedes cinsine ait sivrisinekler arasındaki ortalama genetik uzaklık 0,035 (%3,5) olarak bulundu. *Ae. albopictus* türü örneklerimize ait en düşük genetik uzaklık 0, en yüksek genetik uzaklık ise 0,0016 (%0,16) olarak bulunurken, dış gruplarla beraber incelendiğinde en düşük uzaklığın 0 ve en yüksek uzaklığın 0,1603 (%16,03) olduğu bulundu. Genetik uzaklık sonuçları, 10 sivrisinek örneğinin dizilerinin pairwise analizlerine göre hesaplandı ve standart hatalarının hesaplanmasında 1000 tekrarlı bootstrap testlerinden faydalanıldı (Felsenstein, 1985; Tamura ve Nei, 1993; Kumar ve diğ., 2018) (Tablo 3.8).

0,020 ölçekte oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 3.2'de görülmektedir.

Tablo 3.8. *Ae. albopictus* COI geni için iç ve dış gruplar arasında genetik uzaklık matrisi

S42 *Ae.albopictus* (MK713991)		0,0015	0,0000	0,0015	0,0000	0,0000	0,0015	0,0015	0,0170	0,0186
S58 *Ae.albopictus* (MK714003)	0,0016		0,0015	0,0000	0,0015	0,0015	0,0000	0,0000	0,0172	0,0187
S61 *Ae.albopictus* (MK714006)	0,0000	0,0016		0,0015	0,0000	0,0000	0,0015	0,0015	0,0170	0,0186
S62 *Ae.albopictus* (MK714007)	0,0016	0,0000	0,0016		0,0015	0,0015	0,0000	0,0000	0,0172	0,0187
S63 *Ae.albopictus* (MK714008)	0,0000	0,0016	0,0000	0,0016		0,0000	0,0015	0,0015	0,0170	0,0186
S64 *Ae.albopictus* (MK714009)	0,0000	0,0016	0,0000	0,0016	0,0000		0,0015	0,0015	0,0170	0,0186
S65 *Ae.albopictus* (MK714010)	0,0016	0,0000	0,0016	0,0000	0,0016	0,0016		0,0000	0,0172	0,0187
Ae. albopictus (MH817529.1)	0,0016	0,0000	0,0016	0,0000	0,0016	0,0016	0,0000		0,0172	0,0187
Ae. japonicus (FJ641869.1)	0,1503	0,1524	0,1503	0,1524	0,1503	0,1503	0,1524	0,1524		0,0149
Ae. notoscriptus (MG242508.1)	0,1582	0,1603	0,1582	0,1603	0,1582	0,1582	0,1603	0,1603	0,1103	
Ortalama	0,035									

Yukarı köşegen: Türler arasındaki ikili farklılıkların standart sapması, aşağı köşegen: Türler arasındaki ikili farklılıkların ortalama sayısı.



Şekil 3.2. *Ae. albopictus*'a ait COI gen bölgesi için ML metodu ile oluşturulan moleküler filogenetik ağaç

3.3. *Anopheles funestus*

Yaptığımız çalışmada bir adet sivrisinek örneğimiz filogenetik analizde *An. funestus* olarak belirlendi. Örneğimiz ve dış gruplar birlikte değelendirilerek farklılıklar ortaya konuldu. Tablo 3.9'da G-C oranlarına bakıldığında *An. funestus*'a ait değerlerin %29,86-%34,99 arasında değişkenlik gösterdiği saptandı. Dış gruplarla birlikte düşünüldüğünde ortalama G-C oranı %31,18 olarak belirlendi (Tamura, 1992; Kumar ve diğ., 2018).

S19 örneğimiz ve *An. funestus* (MK300231.1), *An. funestus* (MK300232.1), *An. funestus* (KJ522832.1), *An. funestus* (MH299888.1) göz önüne alındığında 623 baz çiftlik bölgede 78 nükleotitte değişiklik olduğu (%12,52) bütün örnekler (dış gruplar dahil) birlikte incelendiğinde ise 623'de 139 nükleotitte değişiklik olduğu (%22,31) görüldü. Transisyon/Transversiyon oranları (R), Parsimoni Anlamlı Bölgeler, Singleton Bölgeleri Tablo 3.10'da gösterildi. Değişim oranı %12,52 olarak bulunan S19 örneğimiz ile diğer *An. funestus* örneklerinin ClustalW'da benzerlik oranlarına tekrar bakıldığında, örneğimizin diğer *An. funestus* örnekleri ile arasında %84,0668-%85,8601 oran aralığında benzerlik gösterdiği, diğer *An. funestus* örneklerinin ise kendi aralarında %95,4407-%99,859 oran aralığında benzerlik gösterdiği belirlendi.

Tablo 3.9. *An. funestus* COI geni için nükleotid kompozisyonu (%)

Sivrisinek Örneği	T	C	A	G	A-T	G-C
S19 *An. funestus* (MH463063)	38,52	18,14	26,48	16,85	65,01	34,99
An. funestus (MK300231.1)	39,00	15,89	30,02	15,09	69,02	30,98
An. funestus (MK300232.1)	38,84	16,05	30,02	15,09	68,86	31,14
An. funestus (KJ522832.1)	39,17	15,73	30,02	15,09	69,18	30,82
An. funestus (MH299888.1)	39,17	15,73	30,02	15,09	69,18	30,82
An. eiseni (MF172271.1)	39,65	15,09	30,18	15,09	69,82	30,18
An. darlingi (JF923693.1)	40,29	14,45	29,86	15,41	70,14	29,86
An. annulipes (MG712534.1)	38,68	15,25	30,66	15,41	69,34	30,66
Ortalama	39,17	15,79	29,65	15,39	68,82	31,18

Tablo 3.10. *An. funestus* COI geni için nükleotid çifti frekansları

	An. funestus	**Bütün Örnekler (Tablo 3.9)**
Korunmuş Bölge	545/623 (%87,48)	484/623 (%77,69)
Değişken Bölge	78/623 (%12,52)	139/623 (%22,31)
Parsimoni Anlamlı Bölge	1/623 (% 0,16)	67/623 (%10,75)
Singleton Bölgeler	77/623 (%12,36)	72/623 (%11,55)
Eş Çiftler(ii)	592	568
Transisyonel Çiftler(si)	15	21
Transversiyonel Çiftler(sv)	16	34
R(si/sv)	0,91	0,62

Substitüsyon oranlarının maximum likelihood yöntemiyle belirlenmesinde Tamura 3-parameter modeli kullanıldı (Tablo 3.11). Transisyonel substitüsyon oranları A/G ve T/C için 6,81; C/T ve G/A için ise 15,04 olarak hesaplandı. Transversiyonel oranlar Tablo 3.11'de verildi. Bu sonuçlar ışığında hesaplanan transisyon/transversiyon oranı (R) 0,67 olarak hesaplandı. Hesaplamaların yapılmasında kullanılan nükleotid

frekansları A ve T için %34,41; G ve C için %15,59'dur (Tamura, 1992; Kumar ve diğ., 2018).

Tablo 3.11. *An. funestus* COI geni için substitüsyon matrisi

	A	T	C	G
A	-	9,68	4,39	**6,81**
T	9,68	-	**6,81**	4,39
C	9,68	**15,04**	-	4,39
G	**15,04**	9,68	4,39	-

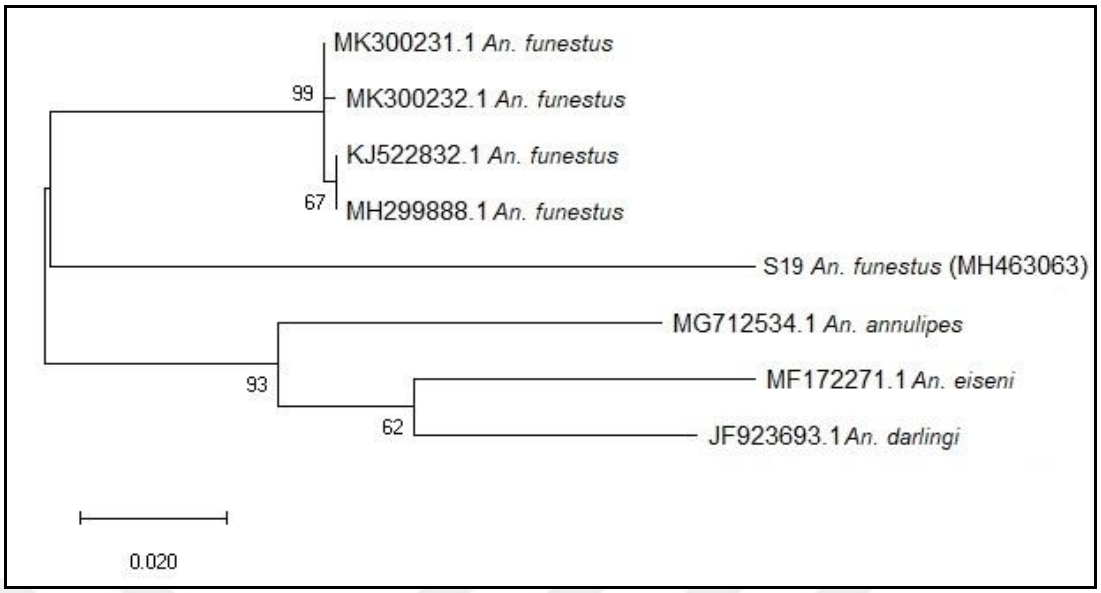
Anopheles cinsine ait sivrisinekler arasındaki ortalama genetik uzaklık 0,1498 (%14,98) olarak bulundu. *An. funestus* türüne ait en düşük genetik uzaklık 0, en yüksek genetik uzaklık ise 0,1805 (%18,05) olarak bulundu. Genetik uzaklık sonuçları, 1 sivrisinek örneğinin dizilerinin dış grup örneklerinin dizileri ile pairwise analizlerine göre hesaplandı ve standart hatalarının hesaplanmasında 1000 tekrarlı bootstrap testlerinden faydalanıldı (Felsenstein, 1985; Tamura ve Nei, 1993; Kumar ve diğ., 2018) (Tablo 3.12).

0,020 ölçekte oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 3.3'de görülmektedir.

Tablo 3.12. *An. funestus* COI geni için iç ve dış gruplar arasında genetik uzaklık matrisi

S19 *An. funestus* (MH463063)		0,0160	0,0162	0,0162	0,0162	0,0184	0,0198	0,0180
An. funestus (MK300231.1)	0,1342		0,0016	0,0016	0,0016	0,0138	0,0134	0,0146
An. funestus (MK300232.1)	0,1362	0,0016		0,0022	0,0022	0,0141	0,0137	0,0147
An. funestus (KJ522832.1)	0,1362	0,0016	0,0032		0,0000	0,0141	0,0131	0,0143
An. funestus (MH299888.1)	0,1362	0,0016	0,0032	0,0000		0,0141	0,0131	0,0143
An. eiseni (MF172271.1)	0,1638	0,1091	0,1110	0,1110	0,1110		0,0121	0,0140
An. darlingi (JF923693.1)	0,1805	0,1017	0,1035	0,0998	0,0998	0,0852		0,0133
An. annulipes (MG712534.1)	0,1616	0,1204	0,1223	0,1185	0,1185	0,1073	0,0961	
Ortalama	0,1498							

Yukarı köşegen: Türler arasındaki ikili farklılıkların standart sapması, aşağı köşegen: Türler arasındaki ikili farklılıkların ortalama sayısı.



Şekil 3.3. *An. funestus*'a ait COI gen bölgesi için ML metodu ile oluşturulan moleküler filogenetik ağaç

3.4. *Anopheles plumbeus*

Toplam 1 örneğe ait COI gen dizisi analizi gerçekleştirildi. NCBI Genebank'dan alınan dış gruplar ile arasındaki genetik farklılıklar ortaya konuldu. Örneklerimize ait G-C oranlarına bakıldığında (Tablo 3.13) *An. plumbeus*'a ait değerlerin %29,79-%32,37 arasında değişkenlik gösterdiği saptandı. Dış gruplarla birlikte düşünüldüğünde ortalama G-C oranı %31,09 olarak belirlendi (Tamura ve Nei, 1993; Kumar ve diğ., 2018).

S9 örneğimiz ve *An. plumbeus* (KM258215.1) göz önüne alındığında 658 baz çiftlik bölgede 0 nükleotitte değişiklik olduğu (%0), bütün örnekler birlikte incelendiğinde ise 658'de 114 nükleotitte değişiklik olduğu (%17,32) görüldü. Transisyon/Transversiyon oranları (R), Parsimoni Anlamlı Bölgeler, Singleton Bölgeleri Tablo 3.14'de gösterilmektedir (Tamura ve Nei, 1993; Kumar ve diğ., 2018).

Tablo 3.13. *An. plumbeus* COI geni için nükleotid kompozisyonu (%)

Sivrisinek Örneği	T	C	A	G	A-T	G-C
S9 *An. plumbeus* (MH463068)	37,99	15,81	29,64	16,57	67,63	32,37
KM258215.1 *An. plumbeus*	37,99	15,81	29,64	16,57	67,63	32,37
MF172271.1 *An. eiseni*	39,67	14,89	30,09	15,35	69,76	30,24
JF923693.1 *An. darlingi*	40,43	14,13	29,79	15,65	70,21	29,79
MG712534.1 *An. annulipes*	38,91	14,89	30,4	15,81	69,3	30,7
Ortalama	39,00	15,11	29,91	15,99	68,91	31,09

Tablo 3.14. *An. plumbeus* COI geni için nükleotid çifti frekansları

	An. plumbeus	**Bütün Örnekler (Tablo 3.13)**
Korunmuş Bölge	658/658 (%100)	544/658 (%82,67)
Değişken Bölge	0/658 (%0)	114/658 (%17,32)
Parsimoni Anlamlı Bölge	0/658 (%0)	59/658 (%8,97)
Singleton Bölgeler	0/658 (%0)	55/658 (%8,36)
Eş Çiftler(ii)	658	598
Transisyonel Çiftler(si)	0	24
Transversiyonel Çiftler(sv)	0	37
R(si/sv)	-	0,64

Substitüsyon oranlarının maximum likelihood yöntemiyle belirlenmesinde Tamura 3-parameter modeli kullanıldı (Tablo 3.15). Transisyonel substitüsyon oranları A/G ve T/C için 6,36; C/T ve G/A için ise 14,09 olarak hesaplandı. Transversiyonel oranlar Tablo 3.15'de verilmiştir. Bu sonuçlar ışığında hesaplanan transisyon/transversiyon oranı (R) 0,59 olarak hesaplandı. Hesaplamaların yapılmasında kullanılan nükleotid frekansları A ve T için %34,45; G ve C için %15,55'dir (Tamura, 1992; Kumar ve diğ., 2018).

Tablo 3.15. *An. plumbeus* COI geni için substitüsyon matrisi

	A	T	C	G
A	-	10,18	4,59	**6,36**
T	10,18	-	**6,36**	4,59
C	10,18	**14,09**	-	4,59
G	**14,09**	10,18	4,59	-

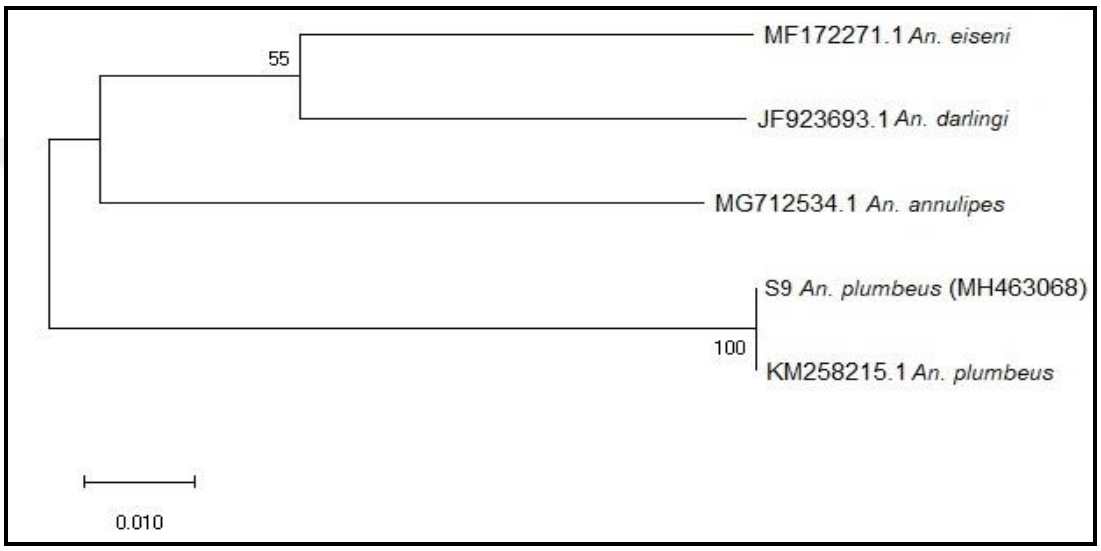
Anopheles cinsine ait sivrisinekler arasındaki ortalama genetik uzaklık 0,0879 (%8,79) olarak bulundu. *An. plumbeus* türüne ait en düşük genetik uzaklık 0, en yüksek genetik uzaklık ise 0,1208 (%15,08) olarak bulundu. Genetik uzaklık sonuçları, 1 sivrisinek örneğinin dizilerinin dış grup örneklerinin dizileri ile pairwise analizlerine göre hesaplandı ve standart hatalarının hesaplanmasında 1000 tekrarlı bootstrap testlerinden faydalanıldı (Felsenstein, 1985; Tamura ve Nei, 1993; Kumar ve diğ., 2018) (Tablo 3.15).

0,010 ölçekte oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 3.4'de görülmektedir.

Tablo 3.16. *An. plumbeus* COI geni için iç ve dış gruplar arasında genetik uzaklık matrisi

S9 *An. plumbeus* (MH463068)		0,0000	0,0134	0,0145	0,0148
KM258215.1 *An. plumbeus*	0,0000		0,0134	0,0145	0,0148
MF172271.1 *An. eiseni*	0,1101	0,1101		0,0113	0,0130
JF923693.1 *An. darlingi*	0,1208	0,1208	0,0821		0,0127
MG712534.1 *An. annulipes*	0,1208	0,1208	0,1082	0,0959	
Ortalama	0,0879				

Yukarı köşegen: Türler arasındaki ikili farklılıkların standart sapması, aşağı köşegen: Türler arasındaki ikili farklılıkların ortalama sayısı.



Şekil 3.4. *An. plumbeus*'a ait COI gen bölgesi için ML metodu ile oluşturulan moleküler filogenetik ağaç

3.5. *Culex species*

Toplam 33 adet *Cx. pipiens complex sp.* örneklerine ait COI gen dizisi analizi gerçekleştirildi ve dış gruplar ile aralarındaki genetik farklılıklar belirlendi. Örneklerimize ait G-C oranlarına bakıldığında (Tablo 3.17) *Cx. pipiens complex sp.* örneklerine ait değerlerin %30,70-%32,25 arasında değişkenlik gösterdiği saptandı. Dış gruplarla birlikte düşünüldüğünde ortalama G-C oranı %31,25 olarak belirlendi (Tamura ve Nei, 1993; Kumar ve diğ., 2018).

S3, S10, S11, S13, S14, S15, S16, S17, S18, S26, S28, S29, S30, S31, S32, S35, S36, S38, S39, S40, S41, S43, S44, S45, S46, S47, S56, S57, S59, S60, S66, S67, S68 örneklerimiz göz önüne alındığında 645 baz çiftlik bölgede 107 nükleotitte değişiklik olduğu (%16,58), bütün örnekler birlikte incelendiğinde ise 645'de 159 nükleotitte değişiklik olduğu (%24,65) görüldü (Tamura ve Nei, 1993; Kumar ve diğ., 2018).

Tablo 3.17. *Cx. pipiens complex sp.* COI geni için nükleotid kompozisyonu (%)

Sivrisinek Örneği	T	C	A	G	A-T	G-C
S3 *Cx. pipiens complex sp.* (MH463070)	39,53	14,88	29,15	16,43	68,68	31,32
S10 *Cx. pipiens complex sp.* (MK713980)	39,53	14,88	29,15	16,43	68,68	31,32
S11 *Cx. pipiens complex sp.* (MH463067)	39,53	14,88	28,99	16,59	68,53	31,47
S13 *Cx. pipiens complex sp.* (MH463066)	39,53	14,88	29,15	16,43	68,68	31,32
S14 *Cx. pipiens complex sp.* (MH463065)	39,22	15,04	30,08	15,66	69,30	30,70
S15 *Cx. pipiens complex sp.* (MH463071)	39,53	14,88	29,15	16,43	68,68	31,32
S16 *Cx. pipiens complex sp.* (MH463059)	39,53	14,88	29,15	16,43	68,68	31,32
S17 *Cx. pipiens complex sp.* (MH463064)	39,38	15,19	29,46	15,97	68,84	31,16
S18 *Cx. pipiens complex sp.* (MH463072)	38,45	15,50	30,23	15,81	68,68	31,32
S26 *Cx. pipiens complex sp.* (MH463073)	39,07	14,88	29,77	16,28	68,84	31,16
S28 *Cx. pipiens complex sp.* (MH463061)	39,53	14,88	29,15	16,43	68,68	31,32
S29 *Cx. pipiens complex sp.* (MH463060)	39,38	14,88	29,30	16,43	68,68	31,32
S30 *Cx. pipiens complex sp.* (MK713981)	39,69	15,19	28,99	16,12	68,68	31,32
S31 *Cx. pipiens complex sp.* (MK713982)	39,53	14,88	29,15	16,43	68,68	31,32
S32 *Cx. pipiens complex sp.* (MK713983)	39,38	14,88	28,99	16,74	68,37	31,63
S35 *Cx. pipiens complex sp.* (MK713985)	39,53	14,88	29,15	16,43	68,68	31,32
S36 *Cx. pipiens complex sp.* (MK713986)	39,53	14,88	29,15	16,43	68,68	31,32
S38 *Cx. pipiens complex sp.* (MK713987)	39,53	14,88	29,30	16,28	68,84	31,16
S39 *Cx. pipiens complex sp.* (MK713988)	39,53	14,88	29,15	16,43	68,68	31,32
S40 *Cx. pipiens complex sp.* (MK713989)	39,07	15,50	28,68	16,74	67,75	32,25
S41 *Cx. pipiens complex sp.* (MK713990)	39,53	14,88	28,99	16,59	68,53	31,47
S43 *Cx. pipiens complex sp.* (MK713992)	39,53	14,88	29,15	16,43	68,68	31,32
S44 *Cx. pipiens complex sp.* (MK713993)	39,53	14,88	29,15	16,43	68,68	31,32
S45 *Cx. pipiens complex sp.* (MK713994)	39,53	14,88	29,15	16,43	68,68	31,32
S46 *Cx. pipiens complex sp.* (MK713995)	39,53	14,88	29,15	16,43	68,68	31,32
S47 *Cx. pipiens complex sp.* (MK713996)	39,53	14,88	29,15	16,43	68,68	31,32
S56 *Cx. pipiens complex sp.* (MK714001)	39,53	14,88	29,15	16,43	68,68	31,32
S57 *Cx. pipiens complex sp.* (MK714002)	39,22	15,04	30,08	15,66	69,30	30,70
S59 *Cx. pipiens complex sp.* (MK714004)	39,22	15,04	29,61	16,12	68,84	31,16
S60 *Cx. pipiens complex sp.* (MK714005)	39,53	14,88	29,30	16,28	68,84	31,16
S66 *Cx. pipiens complex sp.* (MK714011)	38,76	14,88	30,08	16,28	68,84	31,16
S67 *Cx. pipiens complex sp.* (MK714012)	39,53	14,88	29,15	16,43	68,68	31,32
S68 *Cx. pipiens complex sp.* (MK714013)	39,53	14,88	29,30	16,28	68,84	31,16
KM258167.1 *Cx. pipiens*	39,60	14,91	29,19	16,30	68,79	31,21
KF407473.1 *Cx. quinquefasciatus*	39,60	14,91	29,19	16,30	68,79	31,21
FN395171.1 *Cx. pipiens molestus*	39,53	14,88	29,30	16,28	68,84	31,16
KJ401313.1 *Cx. torrentium*	38,60	15,50	30,08	15,81	68,68	31,32
KC407754.1 *Cx. pipiens pallens*	39,38	14,88	29,30	16,43	68,68	31,32
KJ012068.1 *Cx. hortensis*	41,09	15,50	27,91	15,50	68,99	31,01
KJ012174.1 *Cx. theileri*	39,69	15,04	30,08	15,19	69,77	30,23
Ortalama	39,45	14,98	29,29	16,28	68,75	31,25

Transisyon/Transversiyon oranları (R), Parsimoni Anlamlı Bölgeler, Singleton Bölgeleri Tablo 3.18'de gösterilmektedir.

Tablo 3.18. *Cx. pipiens complex sp.* COI geni için Nükleotid çifti frekansları

	Culex sp.	**Bütün Örnekler (Tablo 3.17)**
Korunmuş Bölge	538/645 (%83,41)	486/645 (%75,34)
Değişken Bölge	107/645 (%16,58)	159/645 (%24,65)
Parsimoni Anlamlı Bölge	33/645 (%5,11)	59/645 (%9,14)
Singleton Bölgeler	74/645 (%11,47)	100/645 (%15,50)
Eş Çiftler(ii)	636	631
Transisyonel Çiftler(si)	4	6
Transversiyonel Çiftler(sv)	6	8
R(si/sv)	0,69	0,73

Substitüsyon oranlarının maximum likelihood yöntemiyle belirlenmesinde Tamura 3-parameter modeli kullanıldı (Tablo 3.19). Transisyonel substitüsyon oranları A/G ve T/C için 6,77; C/T ve G/A için ise 14,89 olarak hesaplandı. Transversiyonel oranlar Tablo 3.19'da verildi. Bu sonuçlar ışığında hesaplanan transisyon/transversiyon oranı (R) 0,66 olarak hesaplandı. Hesaplamaların yapılmasında kullanılan nükleotid frekansları A ve T için %34,37; G ve C için %15,63'tür (Tamura, 1992; Kumar ve diğ., 2018).

Tablo 3.19. *Cx. pipiens complex sp.* COI geni için substitüsyon matrisi

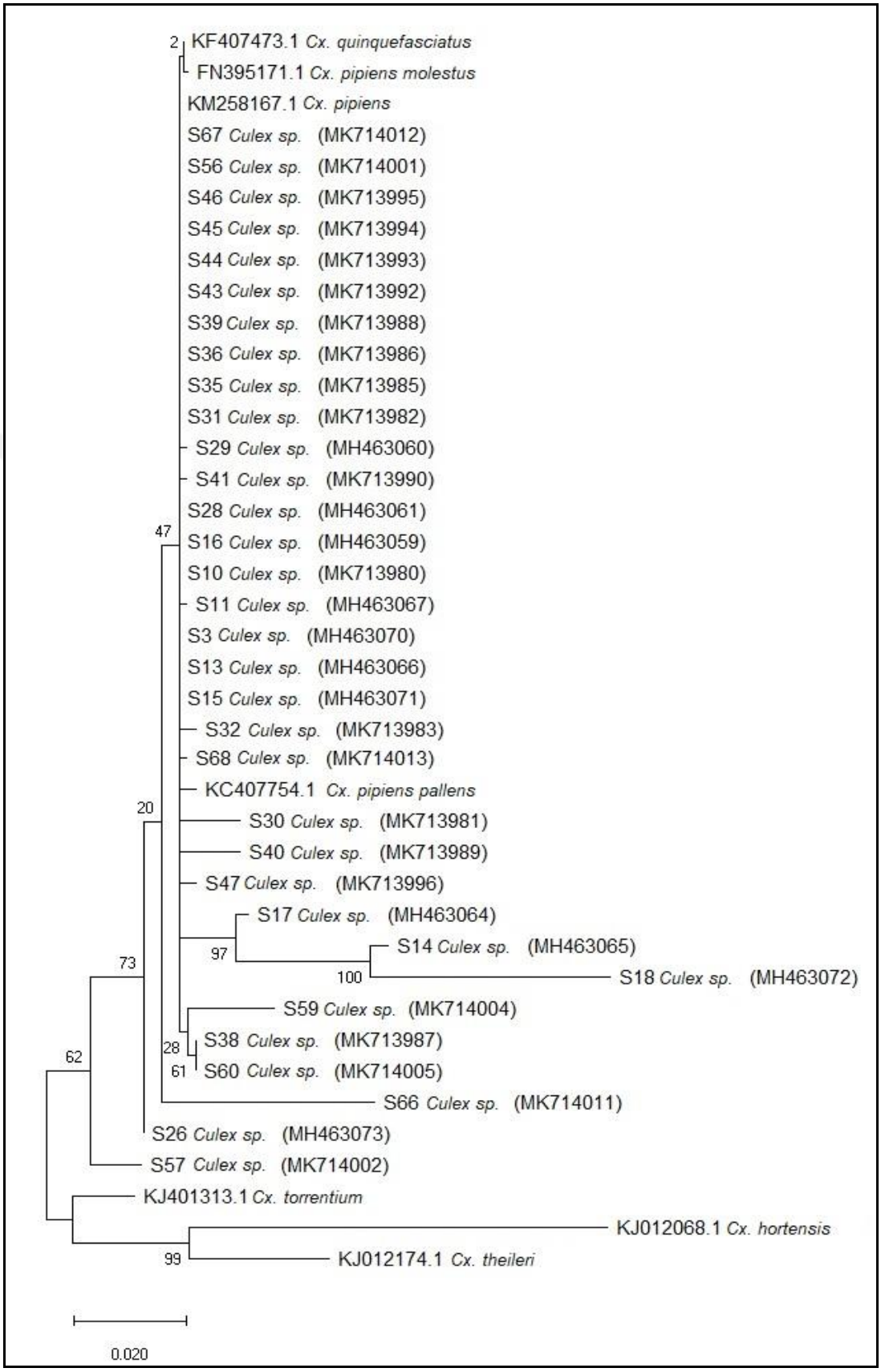
	A	T	C	G
A	-	9,74	4,43	**6,77**
T	9,74	-	**6,77**	4,43
C	9,74	**14,89**	-	4,43
G	**14,89**	9,74	4,43	-

Culex cinsine ait sivrisinekler arasındaki ortalama genetik uzaklık 0,0137 (%1,37) olarak bulundu. *Culex pipiens* türüne ait en düşük genetik uzaklık 0, en yüksek genetik uzaklık ise 0,2387 (%23,87) olarak bulundu. Genetik uzaklık sonuçları, 30 sivrisinek örneğinin dizilerinin pairwise analizlerine göre hesaplandı ve standart hatalarının hesaplanmasında 1000 tekrarlı bootstrap testlerinden faydalanıldı (Felsenstein, 1985; Tamura ve Nei, 1993; Kumar ve diğ., 2018) (Tablo 3.20).

0,020 ölçekte oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 3.5'de görülmektedir.

Tablo 3.20. *Cx. pipiens complex sp.* COI geni için iç ve dış gruplar arasında genetik uzaklık matrisi

| | | |



Şekil 3.5. *Cx. pipiens complex sp.*'e ait COI gen bölgesi için ML metodu ile oluşturulan moleküler filogenetik ağaç

3.6. *Culex torrentium*

Toplam 1 *Cx. torrentium* ve 1 *Culex sp.* örneklerine ait COI gen dizisi analizi gerçekleştirildi ve dış gruplar ile aralarındaki genetik farklılıklar belirlendi. S25 *Cx. torrentium* örneğimizle birlikte diğer *Cx. torrentium* örneklerine (KJ401313.1, KU756484.1, MH807265.1) ait G-C oranlarına bakıldığında (Tablo 3.21) *Cx. torrentium*'a ait değerlerin %31,71-%31,87 arasında değişkenlik gösterdiği saptandı. Genbank'tan alınan diğer gruplarla birlikte düşünüldüğünde ortalama G-C oranı %31,70 olarak belirlendi (Tamura ve Nei, 1993; Kumar ve diğ., 2018).

S25 örneğimiz ve *Cx. torrentium* (KJ401313.1), *Cx. torrentium* (KU756484.1), *Cx. torrentium* (MH807265.1) göz önüne alındığında 634 baz çiftlik bölgede 2 nükleotitte değişiklik olduğu (%0,31), bütün örnekler birlikte incelendiğinde ise 634'de 28 nükleotitte değişiklik olduğu (%4,41) görüldü. Transisyon/Transversiyon oranları (R), Parsimoni Anlamlı Bölgeler, Singleton Bölgeleri Tablo 3.22'de gösterilmektedir (Tamura ve Nei, 1993; Kumar ve diğ., 2018).

Tablo 3.21. *Cx. torrentium* COI geni için nükleotid kompozisyonu (%)

Sivrisinek Örneği	T	C	A	G	A-T	G-C
S25 *Cx. torrentium* (MH463062)	38,49	15,62	29,81	16,09	68,30	31,71
S59 *Culex sp.* (MK714004)	38,96	15,14	29,50	16,40	68,46	31,54
KJ401313.1 *Cx. torrentium*	38,33	15,62	29,97	16,09	68,30	31,71
KU756484.1 *Cx. torrentium*	38,49	15,62	29,81	16,09	68,30	31,71
MH807265.1 *Cx. torrentium*	38,49	15,62	29,65	16,25	68,14	31,87
KM258167.1 *Cx. pipiens*	39,27	14,98	29,02	16,72	68,29	31,70
KF407473.1 *Cx. quinquefasciatus*	39,27	14,98	29,02	16,72	68,29	31,70
Ortalama	38,75	15,37	29,54	16,34	68,30	31,70

Tablo 3.22. *Cx. torrentium* COI geni için nükleotid çifti frekansları

	Cx. torrentium	**Bütün Örnekler (Tablo 3.21)**
Korunmuş Bölge	632/634 (%99,68)	606/634 (%95,58)
Değişken Bölge	2/634 (%0,31)	28/634 (%4,41)
Parsimoni Anlamlı Bölge	0/634 (%0)	18/634 (%2,83)
Singleton Bölgeler	2/634 (%0,31)	10/634 (%1,57)
Eş Çiftler(ii)	633	621
Transisyonel Çiftler(si)	0	8
Transversiyonel Çiftler(sv)	0	5
R(si/sv)	1	1,8

Transisyonel substitüsyon oranları A/G ve T/C için 10,25; C/T ve G/A için ise 22,08 olarak hesaplandı. Transversiyonel oranlar Tablo 3.23'de verilmektedir. Bu sonuçlar ışığında hesaplanan transisyon/transversiyon oranı (R) 1,58 olarak hesaplandı. Hesaplamaların yapılmasında kullanılan nükleotid frekansları A ve T için %34,15; G ve C için %15,85'dir (Tamura, 1992; Kumar ve diğ., 2018).

Tablo 3.23. *Cx. torrentium* COI geni için substitüsyon matrisi

	A	T	C	G
A	-	6,03	2,80	**10,25**
T	6,03	-	**10,25**	2,80
C	6,03	**22,08**	-	2,80
G	**22,08**	6,03	2,80	-

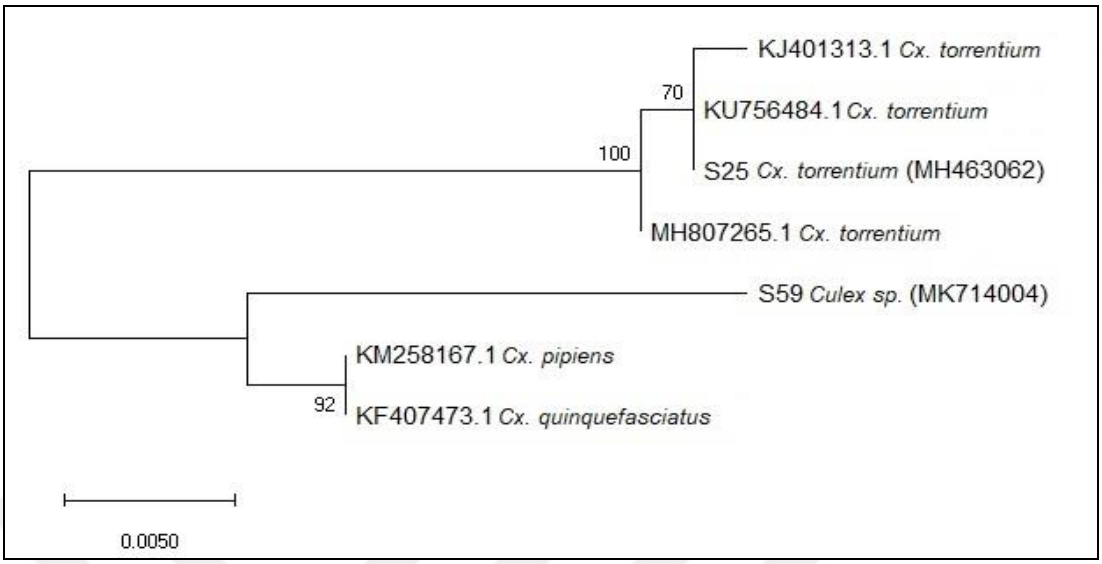
Culex cinsine ait sivrisinekler arasındaki ortalama genetik uzaklık 0,018 (%1,8) olarak bulundu. *Culex torrentium* türüne ait en düşük genetik uzaklık 0, en yüksek genetik uzaklık ise 0,046 (%4,6) olarak bulundu. Genetik uzaklık sonuçları, 1 sivrisinek örneğinin dizilerinin pairwise analizlerine göre hesaplandı ve standart hatalarının hesaplanmasında 1000 tekrarlı bootstrap testlerinden faydalanıldı (Felsenstein, 1985; Tamura ve Nei, 1993; Kumar ve diğ., 2018) (Tablo 3.24).

0,0050 ölçekte oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 3.6'da görülmektedir.

Tablo 3.24. *Cx. torrentium* COI geni için genetik uzaklık matrisi

S25 *Cx. torrentium* (MH463062)		0,010	0,002	0,000	0,002	0,007	0,007
S59 *Culex* sp. (MK714004)	0,044		0,010	0,010	0,009	0,006	0,006
KJ401313.1 *Cx. torrentium*	0,002	0,046		0,002	0,002	0,008	0,008
KU756484.1 *Cx. torrentium*	0,000	0,044	0,002		0,002	0,007	0,007
MH807265.1 *Cx. torrentium*	0,002	0,042	0,003	0,002		0,007	0,007
KM258167.1 *Cx. pipiens*	0,031	0,018	0,033	0,031	0,029		0,000
KF407473.1 *Cx. quinquefasciatus*	0,031	0,018	0,033	0,031	0,029	0,000	
Ortalama	0,018						

Yukarı köşegen: Türler arasındaki ikili farklılıkların standart sapması, aşağı köşegen: Türler arasındaki ikili farklılıkların ortalama sayısı.



Şekil 3.6. *Cx. torrentium*'a ait COI gen bölgesi için ML metodu ile oluşturulan moleküler filogenetik ağaç

3.7. *Culiseta longiareolata*

Toplam 1 örneğe ait COI gen dizisi analizi gerçekleştirildi. Dış gruplar ile beraber genetik farklılıklar ortaya konuldu. Örneğimize ait G-C oranlarına bakıldığında (Tablo 3.25) *Cs. longiareolata*'ya ait değerlerin %31,03-%31,49 arasında değişkenlik gösterdiği saptandı. Dış gruplarla birlikte düşünüldüğünde ortalama G-C oranı %31,16 olarak belirlendi (Tamura ve Nei, 1993; Kumar ve diğ., 2018).

S34 örneğimiz ve *Cs. longiareolata* (HG931139.1), *Cs. longiareolata* (MK170087.1), *Cs. longiareolata* (JQ388785.1) göz önüne alındığında 651 baz çiftlik bölgede 2 nükleotitte değişiklik olduğu (%0,31), bütün örnekler birlikte incelendiğinde ise 651'de 101 nükleotitte değişiklik olduğu (%15,51) görüldü. Transisyon/Transversiyon oranları (R), Parsimoni Anlamlı Bölgeler, Singleton Bölgeleri Tablo 3.26' da gösterilmektedir (Tamura ve Nei, 1993; Kumar ve diğ., 2018).

Tablo 3.25. *Cs. longiareolata* COI geni için nükleotid kompozisyonu (%)

Sivrisinek Örneği	T	C	A	G	A-T	G-C
S34 *Cs. longiareolata* (MK713984)	38,56	15,67	30,26	15,51	68,82	31,18
HG931139.1 *Cs. longiareolata*	38,56	15,67	30,41	15,36	68,97	31,03
MK170087.1 *Cs. longiareolata*	38,56	15,67	30,26	15,51	68,82	31,18
JQ388785.1 *Cs. longiareolata*	38,56	15,67	30,41	15,36	68,97	31,03
KP293420.1 *Cs. incidens*	40,25	15,98	28,26	15,51	68,51	31,49
KM258167.1 *Cx. pipiens*	39,94	14,75	29,03	16,28	68,97	31,03
Ortalama	39,07	15,57	29,77	15,59	68,84	31,16

Tablo 3.26. *Cs. longiareolata* COI geni için nükleotid çifti frekansları

	Cs. longiareolata	**Bütün Örnekler (Tablo 3.25)**
Korunmuş Bölge	649/651 (%99,69)	550/651 (%84,48)
Değişken Bölge	2/651 (%0,31)	101/651 (%15,51)
Parsimoni Anlamlı Bölge	0/651 (%0)	29/651 (%4,45)
Singleton Bölgeler	2/651 (%0,31)	72/651 (%11,05)
Eş Çiftler(ii)	650	610
Transisyonel Çiftler(si)	1	17
Transversiyonel Çiftler(sv)	0	24
R(si/sv)	-	0,69

Transisyonel substitüsyon oranları A/G ve T/C için 7,16; C/T ve G/A için ise 15,82 olarak hesaplandı. Transversiyonel oranlar Tablo 3.27'de gösterilmektedir. Bu sonuçlar ışığında hesaplanan transisyon/transversiyon oranı (R) 0,73 olarak hesaplandı. Hesaplamaların yapılmasında kullanılan nükleotid frekansları A ve T için %34,42; G ve C için %15,58'dir (Tamura, 1992; Kumar ve diğ., 2018).

Tablo 3.27. *Cs. longiareolata* COI geni için substitüsyon matrisi

	A	T	C	G
A	-	9,30	4,21	**7,16**
T	9,30	-	**7,16**	4,21
C	9,30	**15,82**	-	4,21
G	**15,82**	9,30	4,21	-

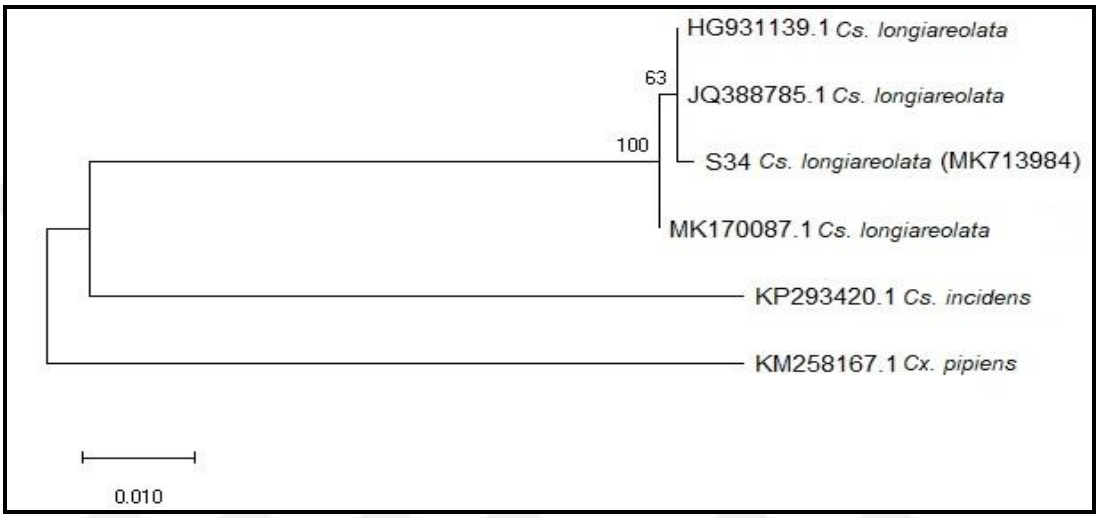
Tamura 3-parameter modeline göre oluşturulan pairwise genetik uzaklık matrisinde *Culiseta* cinsine ait sivrisinekler arasındaki ortalama genetik uzaklık 0,0554 (%5,54) olarak bulundu. *Cs. longiareolata* türüne ait en düşük genetik uzaklık 0, en yüksek genetik uzaklık ise 0,0031 (%0,31) olarak bulundu. Genetik uzaklık sonuçları, 1 sivrisinek örneğinin dizilerinin pairwise analizlerine göre hesaplandı ve standart hatalarının hesaplanmasında 1000 tekrarlı bootstrap testlerinden faydalanıldı (Felsenstein, 1985; Tamura ve Nei, 1993; Kumar ve diğ., 2018) (Tablo 3.28).

0,010 ölçekte oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 3.7'de görülmektedir.

Tablo 3.28. *Cs. longiareolata* COI geni için genetik uzaklık matrisi

S34 *Cs. longiareolata* (MK713984)		0,0015	0,0022	0,0015	0,0198	0,0197
Cs. longiareolata (HG931139.1)	0,0015		0,0015	0,0000	0,0196	0,0197
Cs. longiareolata (MK170087.1)	0,0031	0,0015		0,0015	0,0192	0,0201
Cs. longiareolata (JQ388785.1)	0,0015	0,0000	0,0015		0,0196	0,0197
Cs. incidens (KP293420.1)	0,1346	0,1319	0,1292	0,1319		0,0208
Cx. pipiens (KM258167.1)	0,1362	0,1362	0,1389	0,1362	0,1497	
Ortalama	0,0554					

Yukarı köşegen: Türler arasındaki ikili farklılıkların standart sapması, aşağı köşegen: Türler arasındaki ikili farklılıkların ortalama sayısı.



Şekil 3.7. *Cs. longiareolata*'ya ait COI gen bölgesi için ML metodu ile oluşturulan moleküler filogenetik ağaç

3.8. ITS2 Barkod Geni Açısından *Culex species*

Toplam 34 adet *Culex* cinsi örneğine ait ITS2 gen dizisi analizi gerçekleştirilmiş olup dış gruplar ile aralarındaki genetik farklılıklar belirlendi. Bu örneklere ait G-C oranlarına bakıldığında (Tablo 3.29) *Culex* cinsine ait değerlerin %56,82-%59,42 arasında değişkenlik gösterdiği saptandı. Dış gruplarla birlikte düşünüldüğünde ortalama G-C oranı %58,40 olarak belirlendi (Tamura ve Nei, 1993; Kumar ve diğ., 2018).

S3, S10, S11, S13, S14, S15, S16, S17, S18, S25, S26, S28, S29, S30, S31, S32, S35, S36, S38, S39, S40, S41, S43, S44, S45, S46, S47, S56, S57, S59, S60, S66, S67, S68 örneklerimiz ve *Cx. pipiens* (U22116.1), *Cx. pipiens molestus* (EF539853.1), *Cx. quinquefasciatus* (HQ848572.1) örneklerinin ayrı olarak incelenmesi sonucu 308 baz çiftlik bölgede 148 nükleotitte değişiklik olduğu (%48,05), bütün örnekler birlikte incelendiğinde ise yine aynı sonucu verdiği, yani 308 baz çiftlik bölgede yine 148 nükleotitte değişiklik olduğu (%48,05) görüldü.

Transisyon/Transversiyon oranları (R), Parsimoni Anlamlı Bölgeler, Singleton Bölgeleri Tablo 3.30'da gösterilmiştir (Tamura ve Nei, 1993; Kumar ve diğ., 2018).

Tablo 3.29. *Cx. pipiens complex sp.* ITS2 geni için nükleotid kompozisyonu (%)

Sivrisinek Örneği	T	C	A	G	A-T	G-C
S3 ITS2	18,83	31,17	22,73	27,27	41,56	58,44
S10 ITS2	19,16	33,77	23,70	23,38	42,86	57,14
S11 ITS2	19,16	31,49	22,40	26,95	41,56	58,44
S13 ITS2	18,83	31,49	22,40	27,27	41,23	58,77
S14 ITS2	18,83	31,82	22,40	26,95	41,23	58,77
S15 ITS2	19,81	30,19	22,73	27,27	42,53	57,47
S16 ITS2	18,83	31,49	22,40	27,27	41,23	58,77
S17 ITS2	18,83	31,82	22,40	26,95	41,23	58,77
S18 ITS2	18,51	31,49	24,03	25,97	42,53	57,47
S25 ITS2 *Cx. torrentium*	21,43	30,52	21,43	26,62	42,86	57,14
S26 ITS2	18,83	31,49	22,40	27,27	41,23	58,77
S28 ITS2	18,51	34,09	22,73	24,68	41,23	58,77
S29 ITS2	18,83	31,49	22,73	26,95	41,56	58,44
S30 ITS2	18,83	31,17	22,73	27,27	41,56	58,44
S31 ITS2	18,83	30,84	23,05	27,27	41,88	58,12
S32 ITS2	18,83	31,49	22,40	27,27	41,23	58,77
S35 ITS2F	18,83	31,17	22,40	27,60	41,23	58,77
S36 ITS2F	18,83	31,49	22,40	27,27	41,23	58,77
S38 ITS2F	19,16	30,84	23,05	26,95	42,21	57,79
S39 ITS2F	18,83	31,49	22,40	27,27	41,23	58,77
S40 ITS2F	20,13	31,17	21,43	27,27	41,56	58,44
S41 ITS2F	20,78	25,00	21,75	32,47	42,53	57,47
S43 ITS2F	20,13	29,22	23,05	27,60	43,18	56,82
S44 ITS2F	19,16	31,49	21,75	27,60	40,91	59,09
S45 ITS2F	18,83	31,49	22,40	27,27	41,23	58,77
S46 ITS2F	18,83	31,49	22,40	27,27	41,23	58,77
S47 ITS2F	18,51	30,84	22,73	27,92	41,23	58,77
S56 ITS2F	19,48	30,52	23,38	26,62	42,86	57,14
S57 ITS2F	18,83	31,49	21,75	27,92	40,58	59,42
S59 ITS2F	18,83	31,49	22,40	27,27	41,23	58,77
S60 ITS2F	18,83	31,49	22,40	27,27	41,23	58,77
S66 ITS2	18,83	31,49	22,73	26,95	41,56	58,44
S67 ITS2	19,48	31,17	21,75	27,60	41,23	58,77
S68 ITS2F	18,83	31,49	22,40	27,27	41,23	58,77
U22116.1 *Cx. pipiens*	18,83	31,17	22,73	27,27	41,56	58,44
HQ848572.1 *Cx. quinquefasciatus*	19,16	31,49	22,08	27,27	41,23	58,77
EF539853.1 *Cx. pipiens molestus*	18,83	31,49	22,40	27,27	41,23	58,77
Ortalama	19,10	31,21	22,50	27,18	41,60	58,40

Tablo 3.30. *Cx. pipiens complex sp.* ITS2 geni için nükleotid çifti frekansları

	Culex sp.	**Bütün Örnekler (Tablo 3.29)**
Korunmuş Bölge	160/308 (%51,95)	160/308 (%51,95)
Değişken Bölge	148/308 (%48,05)	148/308 (%48,05)
Parsimoni Anlamlı Bölge	65/308 (%21,10)	65/308 (%21,10)
Singleton Bölgeler	83/308 (%26,95)	83/308 (%26,95)
Eş Çiftler(ii)	290	292
Transisyonel Çiftler(si)	7	6
Transversiyonel Çiftler(sv)	11	10
R(si/sv)	0, 6135	0, 6088

Substitüsyon oranlarının maximum likelihood yöntemiyle belirlenmesinde Tamura 3-parameter modeli kullanıldı (Tablo 3.31). Transisyonel substitüsyon oranları A/G ve T/C için 11,72; C/T ve G/A için ise 8,35 olarak hesaplandı. Transversiyonel oranlar Tablo 3.31'de verilmmektedir. Bu sonuçlar ışığında hesaplanan transisyon/transversiyon oranı (R) 0,65 olarak hesaplandı. Hesaplamaların yapılmasında kullanılan nükleotid frekansları A ve T için %20,80; G ve C için %29,20'dir (Tamura, 1992; Kumar ve diğ., 2018).

Tablo 3.31. *Cx. pipiens complex sp.* ITS2 geni için substitüsyon matrisi

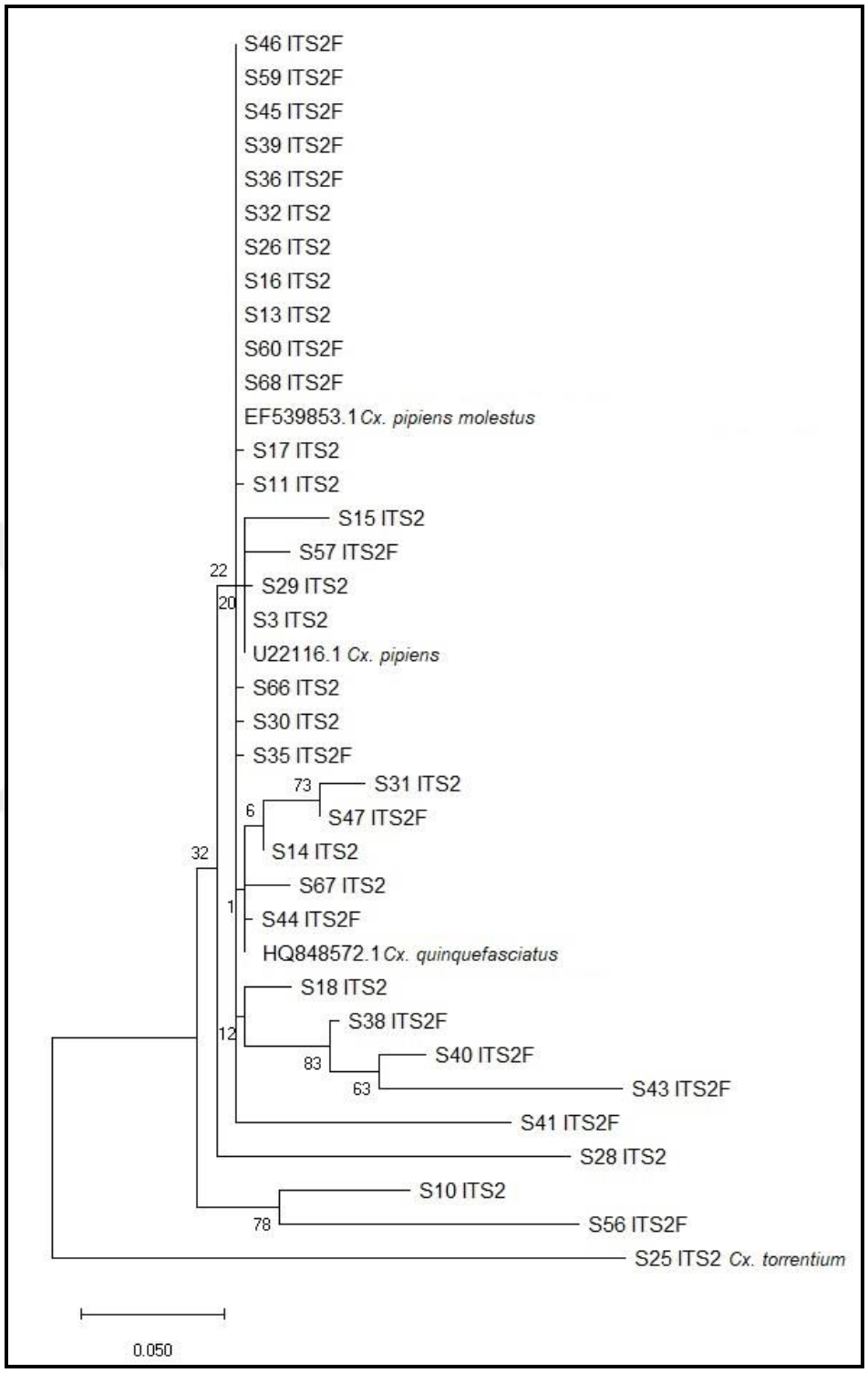
	A	T	C	G
A	-	6,23	8,74	**11,72**
T	6,23	-	**11,72**	8,74
C	6,23	**8,35**	-	8,74
G	**8,35**	6,23	8,74	-

Culex cinsine ait sivrisinekler arasındaki ortalama genetik uzaklık 0,0400 (%4,00) olarak bulundu. *Cx. pipiens* türüne ait en düşük genetik uzaklık 0, en yüksek genetik uzaklık ise 0,6860 (%68,6) olarak bulundu. Genetik uzaklık sonuçları, 34 sivrisinek örneğinin dizilerinin pairwise analizlerine göre hesaplandı ve standart hatalarının hesaplanmasında 1000 tekrarlı bootstrap testlerinden faydalanıldı (Felsenstein, 1985; Tamura ve Nei, 1993; Kumar ve diğ., 2018) (Tablo 3.32).

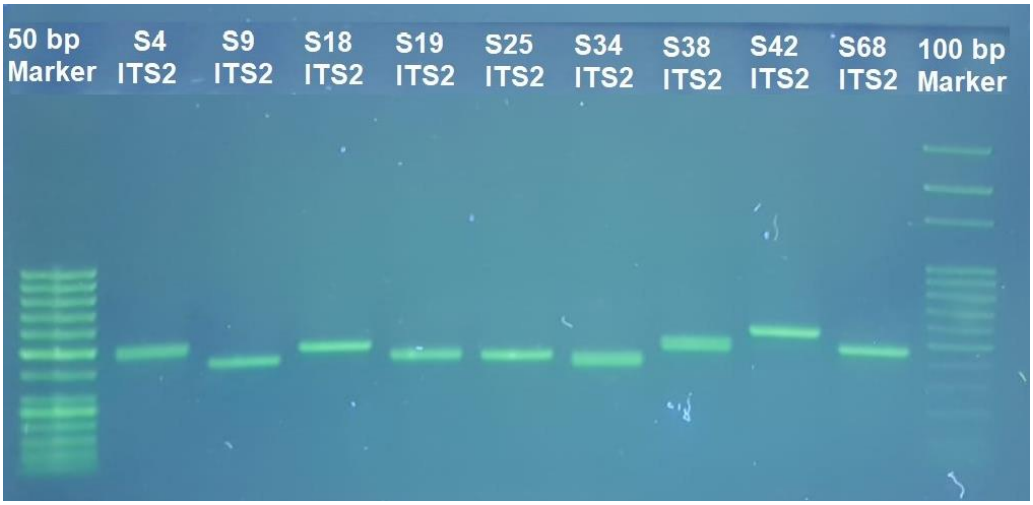
0,050 ölçekte oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 3.9'da görülmektedir.

Tablo 3.32. Culex sp. örneklerinin ITS2 gen bölgesi genetik uzaklık matrisi

| | | |



Şekil 3.8. *Cx. pipiens complex sp.* örneklerinin ve dış grupların ITS2 gen bölgesi ile ML metodu kullanılarak oluşturulmuş filogenetik ağaç



Şekil 3.9. S4 (*Ae. geniculatus*), S9 (*An. plumbeus*), S18 (*Cx. pipiens complex sp.*), S19 (*An. funestus*), S25 (*Cx. torrentium*), S34 (*Cs. longiareolata*), S38 (*Cx. pipiens complex sp.*), S42 (*Ae. albopictus*) ve S68 (*Cx. pipiens complex sp.*) ITS2 sivrisinek örneklerimize ait agaroz jel elektroforezi

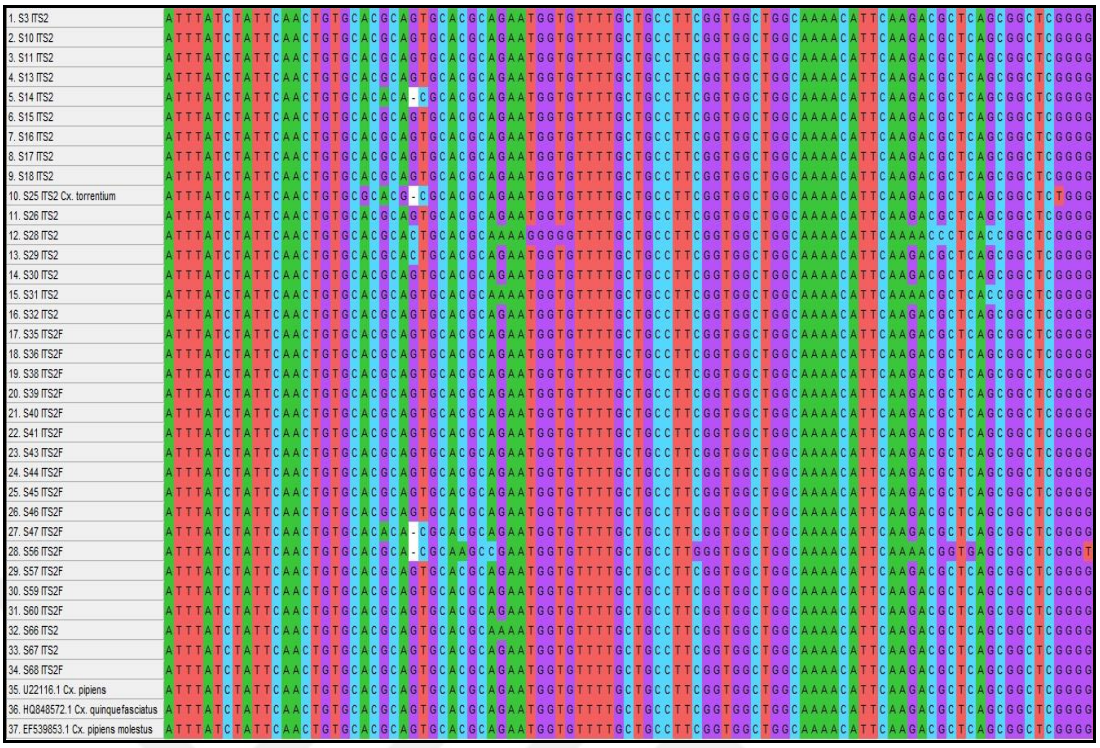
Şekil 3.10 incelendiğinde, S3 *Culex sp.* sivrisinek örneğimize ait 5.8S rDNA-ITS2-28S rDNA dizisi görülmektedir. Sarı boyalı kısım 88 adet bazdan oluşan kısmi 5.8S rDNA bölgesi, mavi boyalı 326 bazdan oluşan ITS2 gen dizisi, yeşil boyalı kısım ise 28S rDNA bölgesinin 5' ucuna ait kısmi sekansıdır. ITS2 gen bölgesinin 5.8S ve 28S rDNA bölgeleri arasında gömülü olduğunu görmekteyiz. ITS2 gen bölgesini ortaya çıkarmak için kullandığımız ileri primerimiz ilk 22 baz, geri primerimiz ise son 23 bazdan oluşmaktadır.

TGTGAACTGCAGGACACATGAACACCGACAGTTGAACGCATATTGCACATCGT
ACAACAGTACGATGTACACATTTTTGAGTGCCTATATTTATCTATTCAACTGTGC
ACGCAGTGCACGCAGAATGGTGTTTTGCTGCCTTCGGTGGCTGGCAAAACATT
CAAGACGCTCAGCGGCTCGGGGTTTTCGTTCGGCGGACGGCCACACTGGTGC
GCACGCACGCGACTGAACGGACGACGACGGTGAGAATACATCCCACACACCA
ACCTGGCTTGGGCGCCGATGTAGCATCTCTCACGCACACGTCGTCGTCACACG
TTCGTTCGGTCATCCGGCGTCGTCGCGGTACCGCGTCCACAGAACAGAACAAC
CCAACACACGAGCAGCGAACGACAAGCGATAAGATAAACCCCCATGTAGGCCT
CAAATAATGTGTGACTACCCCCTAAATTTAAGCAT

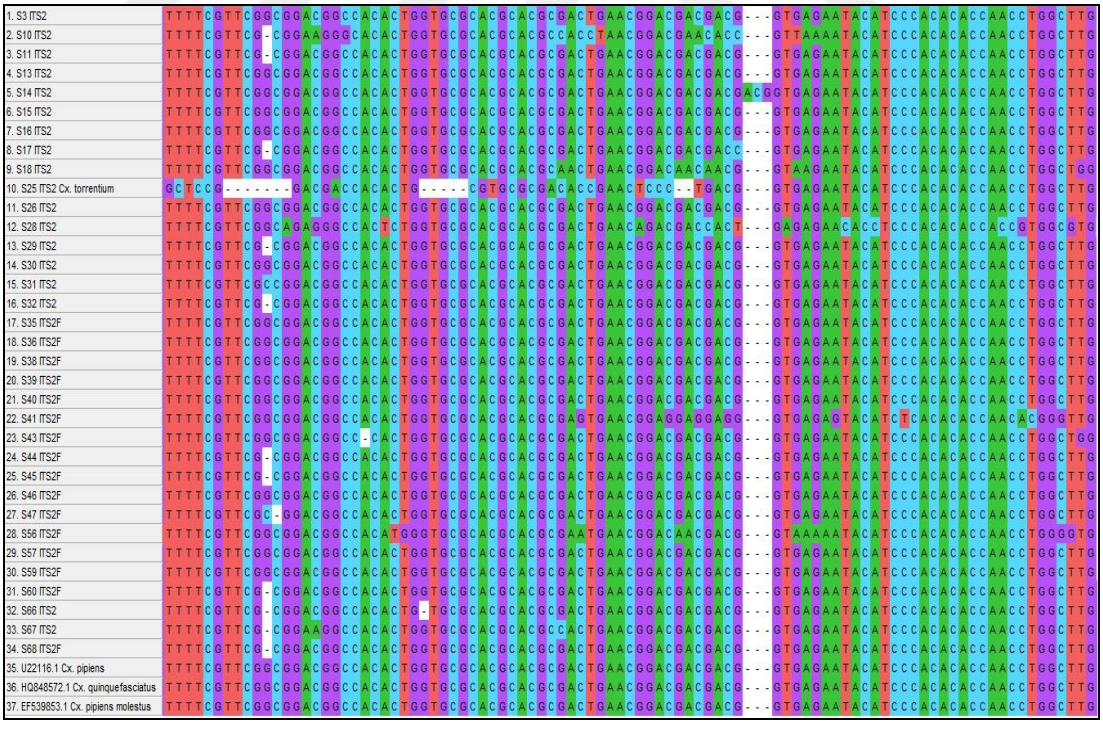
Şekil 3.10. S3 *Culex sp.* sivrisinek örneğimize ait 5.8S rDNA-ITS2-28S rDNA dizisi

Tablo 3.33 incelendiğinde baz uzunluğunun 321-330 arasında değiştiği görülmektedir. S25 örneğimiz olan *Cx. torrentium* ITS2 gen dizisi 353 baz çiftine karşılık gelmiştir. Ortalama GC içeriği %57,14 olarak tespit edildi (Tablo 3.29).

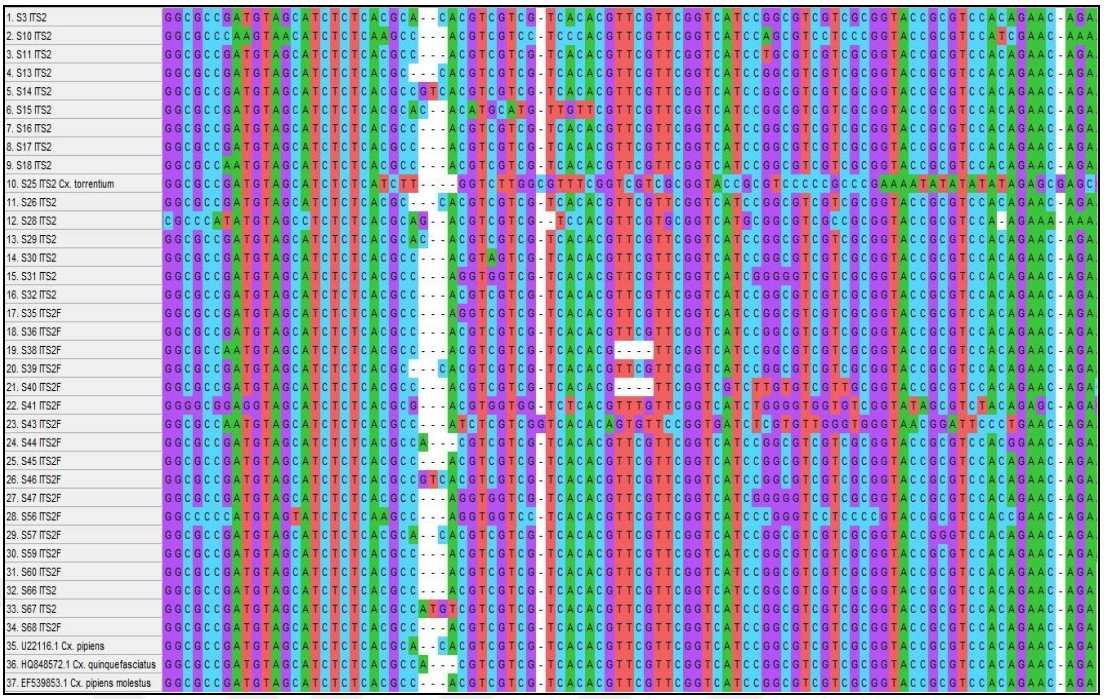
Şekil 3.11a, Şekil 3.11b, Şekil 3.11c ve Şekil 3.11d incelendiğinde ITS2 gen bölgesinin farklı uzunluklarda olduğu görülmektedir.



Şekil 3.11a. Culex örneklerine ait ITS2 gen bölgesi dizilerinin MEGA X programı üzerindeki FASTA görünümünü göstermektedir



Şekil 3.11b. *Culex* örneklerine ait ITS2 gen bölgesi dizilerinin MEGA X programı üzerindeki FASTA görünümü Şekil 3.11a'nın devamını göstermektedir



Şekil 3.11c. *Culex* örneklerine ait ITS2 gen bölgesi dizilerinin MEGA X programı üzerindeki FASTA görünümü Şekil 3.11b'nin devamını göstermektedir



Şekil 3.11d. *Culex* örneklerine ait ITS2 gen bölgesi dizilerinin MEGA X programı üzerindeki FASTA görünümü Şekil 3.11c'nin devamını göstermektedir

Tablo 3.33. 34 adet *Culex* cinsi sivrisinek örneklerinin NCBI GenBanktan elde edilen *Culex pipiens* kompleksi türlere ait ITS2 ve COI dizileri ile karşılaştırılması

Türkiye-Kocaeli	Örneğe ait ITS2 baz çifti sayısı	Tür	Karşılaştırılan ITS2 Erişim numarası	ITS2 % benzerlik oranları	Örneğe ait COI baz çifti sayısı	Karşılaştırılan COI Erişim numarası	COI benzerlik oranı %
S3	326	*Cx. pipiens*	U22116.1	100	688	HE997152.1	100
		Cx.pipiens pipiens	DQ341115.1	99,69		KU756485.1	100
		Cx. pipiens molestus	KU495643.1	99,39		MG712551.1	100
		Cx.quinquefasciatus	HQ848572.1	99,39		MG712557.1	100
S10	324	*Cx.pipiens* complex sp.	HQ881702.1	92,59	634	KJ401311.1	100
		Cx. pipiens molestus	KU495641.1	94,59		MG712550.1	100
		Cx.pipiens pipiens	DQ341109.1	92,28		JQ253843.1	100
		Cx.quinquefasciatus	FJ416045.1	91,67		MH374863.1	100
S11	324	*Cx. pipiens molestus*	KU495641.1	99,69	688	MG712551.1	99,85
		Cx.pipiens pipiens	DQ341109.1	99,69		KU756485.1	99,85
		Cx.pipiens complex sp.	HQ881694.1	99,69		HE997152.1	99,85
		Cx.quinquefasciatus	HQ848572.1	99,08		MG712557.1	99,85
S13	325	*Cx.pipiens*	LC114272.1	100	686	KJ401311.1	100
		Cx. pipiens molestus	EF539853.1	99,70		MG712551.1	100
		Cx.pipiens pipiens	DQ341115.1	100		KU756485.1	100
		Cx.quinquefasciatus	FJ416055.1	98,78		MG712556.1	100
S14	330	*Cx. pipiens molestus*	KU495644.1	99,70	568	MG712552.1	95,94
		Cx.quinquefasciatus	HQ404255.1	100		MG712556.1	95,95
		Cx. pipiens complex sp.	HQ881710.1	98,49		MN460845.1	95,95
S15	257	*Cx. pipiens molestus*	KU495643.1	99,61	693	MG712551.1	100
		Cx.pipiens pipiens	KU175324.1	99,61		KU756485.1	100
		Cx.pipiens complex sp.	HQ881699.1	99,61		KJ401311.1	100
		Cx.quinquefasciatus	FJ416047.1	98,83		MG712557.1	100
S16	325	*Cx. pipiens*	LC114272.1	100	709	MG712551.1	100
		Cx.pipiens molestus	EF539853.1	100		KU756485.1	99,85
		Cx.quinquefasciatus	HQ848572.1	99,69		MG712557.1	100
S17	324	*Cx.pipiens pipiens*	DQ341109.1	99,03	634	FN395183.1	98,58
		Cx. pipiens molestus	KU495641.1	99,69		MG712552.1	98,73
		Cx.quinquefasciatus	FJ416045.1	99,07		MF278808.1	98,74

Tablo 3. 33. (Devam) 34 adet *Culex* cinsi sivrisinek örneklerinin NCBI GenBanktan elde edilen *Culex pipiens* kompleksi türlere ait ITS2 ve COI dizileri ile karşılaştırılması

Türkiye-Kocaeli	**Örneğe ait ITS2 baz çifti sayısı**	**Tür**	**Karşılaştırılan ITS2 Erişim numarası**	**ITS2 % benzerlik oranları**	**Örneğe ait COI baz çifti sayısı**	**Karşılaştırılan COI Erişim numarası**	**COI benzerlik oranı %**
S18	325	*Cx. pipiens*	LC114272.1	98,15	503	KM439040.1	91,65
		Cx.pipiens molestus	EF539853.1	98,15		MG712552.1	91,65
		Cx.quinquefasciatus	HQ848572.1	97,85		MF179208.1	91,67
S25	353	*Cx. torrentium*	AJ850083.1	97,40	688	HE997145.1	100
		Cx.quinquefasciatus	KU495653.1	88,04		MH423504.1	97,37
		Cx.pipiens complex sp.	HQ881695.1	87,50		MK047311.1	97,38
		Cx.australicus	KU495639.1	81,88		-	-
S26	325	*Cx. pipiens*	LC114272.1	100	699	HE997150.1	99,54
		Cx. pipiens molestus	EF539853.1	100		MG712551.1	99,41
		Cx.pipiens pipiens	DQ341115.1	100		KU756485.1	99,25
		Cx.quinquefasciatus	HQ848572.1	99,69		MG712557.1	99,41
S28	324	*Cx. pipiens* complex sp.	HQ881697.1	87,77	695	KJ401311.1	100
		Cx. pipiens molestus	KU495643.1	87,73		MG712551.1	100
		Cx.pipiens pipiens	DQ341115.1	87,46		KU756485.1	99,85
		Cx.quinquefasciatus	HQ848572.1	87,77		MG712557.1	100
S29	325	*Cx. pipiens molestus*	KU495641.1	99,38	632	MG712552.1	100
		Cx. pipiens complex	HQ881674.1	99,38		KX260940.1	100
		Cx.pipiens pipiens	DQ341109.1	99,38		FN395183.1	99,84
		Cx.quinquefasciatus	HQ848572.1	98,77		KC250017.1	100
S30	325	*Cx. pipiens*	LC114272.1	99,69	646	KJ401311.1	99,68
		Cx. pipiens molestus	EF539853.1	99,69		MG712551.1	99,68
		Cx.pipiens pipiens	DQ341115.1	99,69		JQ253842.1	99,68
		Cx.quinquefasciatus	HQ848570.1	98,47		MG712557.1	99,68
S31	325	*Cx. pipiens*	LC114272.1	97,54	699	KJ401311.1	100
		Cx.pipiens pipiens	DQ341115.1	97,54		KU756485.1	99,85
		Cx. pipiens molestus	EF539853.1	97,54		MG712551.1	100
		Cx.quinquefasciatus	HQ848572.1	97,23		MG712557.1	100
S32	324	*Cx. pipiens*	LC120318.1	100	523	MN460845.1	99,62
		Cx. pipiens molestus	KU495641.1	100		MG712552.1	99,61
		Cx.pipiens pipiens	DQ341109.1	100		-	-
		Cx.quinquefasciatus	HQ848572.1	99,38		KC250017.1	99,62

Tablo 3. 33. (Devam) 34 adet *Culex* cinsi sivrisinek örneklerinin NCBI GenBanktan elde edilen *Culex pipiens* kompleksi türlere ait ITS2 ve COI dizileri ile karşılaştırılması

Türkiye-Kocaeli	**Örneğe ait ITS2 baz çifti sayısı**	**Tür**	**Karşılaştırılan ITS2 Erişim numarası**	**ITS2 % benzerlik oranları**	**Örneğe ait COI baz çifti sayısı**	**Karşılaştırılan COI Erişim numarası**	**COI benzerlik oranı %**
S35	327	*Cx. pipiens*	LC114272.1	99,08	692	MK047311.1	99,86
		Cx. pipiens molestus	EF539853.1	99,08		FN395171.1	99,71
		Cx. pipiens pipiens	DQ341115.1	99,08		FN395183.1	99,85
		Cx. quinquefasciatus	HQ848572.1	98,78		MH423504.1	99,71
S36	325	*Cx. pipiens*	LC114272.1	100	698	MK047311.1	99,86
		Cx. pipiens molestus	KU495641.1	99,69		FN395171.1	99,57
		Cx. pipiens pipiens	DQ341109.1	99,69		FN395183.1	99,71
		Cx. quinquefasciatus	HQ848572.1	99,69		MH423504.1	99,71
S38	317	*Cx. pipiens*	U22114.1	98,12	698	AB690842.1	100
		Cx. pipiens molestus	EF539853.1	96,62		MG712551.1	99,85
		Cx. pipiens pipiens	DQ341115.1	96,62		KU756485.1	99,70
		Cx. quinquefasciatus	KX866009.1	97,82		MG712557.1	99,85
S39	325	*Cx. pipiens*	LC114272.1	100	699	KJ401311.1	100
		Cx. pipiens molestus	EF539853.1	100		MG712551.1	100
		Cx. pipiens pipiens	DQ341115.1	100		KU756485.1	99,85
		Cx. quinquefasciatus	HQ848572.1	99,69		MG712557.1	100
S40	321	*Cx. pipiens*	U22114.1	95,64	681	MK047311.1	98,83
		Cx. pipiens molestus	EF539853.1	94,83		FN395171.1	98,67
		Cx. pipiens pipiens	DQ341115.1	94,83		FN395183.1	98,82
		Cx. quinquefasciatus	HQ848570.1	95,43		FN395201.1	98,67
S41	329	*Cx. pipiens*	LC114272.1	89,97	699	MK300247.1	100
		Cx. pipiens molestus	EF539853.1	89,97		MG712551.1	99,85
		Cx. pipiens pipiens	DQ341115.1	89,97		KU756485.1	99,70
		Cx. quinquefasciatus	FJ416038.1	90,54		MH538709.1	100
S43	325	*Cx. pipiens*	FJ644335.1	97,75	699	KJ401311.1	100
		Cx. pipiens molestus	KU495642.1	96,44		MG712551.1	100
		Cx. pipiens pipiens	DQ341114.1	96,55		KU756485.1	99,85
		Cx. quinquefasciatus	HQ848570.1	97,38		MG712557.1	100
S44	324	*Cx. pipiens*	HQ881678.1	99,69	699	KJ401311.1	100
		Cx. pipiens molestus	KU495641.1	99,38		MG712551.1	100
		Cx. pipiens pipiens	DQ341109.1	99,38		KU756485.1	99,85
		Cx. quinquefasciatus	HQ848572.1	99,38		MG712557.1	100

Tablo 3. 33. (Devam) 34 adet *Culex* cinsi sivrisinek örneklerinin NCBI GenBanktan elde edilen *Culex pipiens* kompleksi türlere ait ITS2 ve COI dizileri ile karşılaştırılması

Türkiye-Kocaeli	**Örneğe ait ITS2 baz çifti sayısı**	**Tür**	**Karşılaştırılan ITS2 Erişim numarası**	**ITS2 % benzerlik oranları**	**Örneğe ait COI baz çifti sayısı**	**Karşılaştırılan COI Erişim numarası**	**COI benzerlik oranı %**
S45	324	*Cx. pipiens*	LC120318.1	100	646	KJ401311.1	100
		Cx. pipiens molestus	KU495641.1	100		MG712551.1	100
		Cx. pipiens pipiens	DQ341109.1	100		JQ253842.1	100
		Cx. quinquefasciatus	HQ848572.1	99,38		MG712557.1	100
S46	328	*Cx. pipiens*	JQ958367.1	100	696	KJ401311.1	100
		Cx. pipiens molestus	KU495643.1	99,09		MG712551.1	100
		Cx. pipiens pipiens	EF539855.1	99,09		KU756485.1	99,85
		Cx. quinquefasciatus	HQ404254.1	98,78		MG712557.1	100
S47	323	*Cx. pipiens* complex sp.	HQ881704.1	98,45	649	MK047304.1	99,84
		Cx. pipiens molestus	KX866003.1	97,85		MG712551.1	99,84
		Cx. pipiens pipiens	DQ341109.1	97,84		KU756485.1	99,69
		Cx. quinquefasciatus	KU495651.1	98,45		MG712557.1	99,84
S56	327	*Cx. pipiens* complex sp.	HQ881695.1	86,28	700	KJ401311.1	100
		Cx. pipiens molestus	-	-		MG712551.1	100
		Cx. pipiens pipiens	-	-		KU756485.1	99,85
		Cx. quinquefasciatus	-	-		MG712557.1	100
S57	326	*Cx. pipiens*	U22116.1	98,16	699	KM258189.1	100
		Cx. pipiens molestus	EF539853.1	97,85		LC054466.1	99,85
		Cx. pipiens pipiens	DQ341115.1	97,85		FN395186.1	97,54
		Cx. quinquefasciatus	HQ848572.1	97,55		MH423504.1	97,69
S59	325	*Cx. pipiens*	LC114272.1	100	581	MN460845.1	100
		Cx. pipiens molestus	EF539853.1	100		MG712552.1	100
		Cx. pipiens pipiens	DQ341115.1	100		FN395183.1	99,83
		Cx. quinquefasciatus	HQ848572.1	99,69		KC250017.1	100
S60	324	*Cx. pipiens*	LC120318.1	100	693	AB690842.1	100
		Cx. pipiens molestus	KU495641.1	100		MG712551.1	99,85
		Cx. pipiens pipiens	DQ341109.1	100		KU756485.1	99,70
		Cx. quinquefasciatus	HQ848572.1	99,38		MG712557.1	99,85

Tablo 3. 33. (Devam) 34 adet *Culex* cinsi sivrisinek örneklerinin NCBI GenBanktan elde edilen *Culex pipiens* kompleksi türlere ait ITS2 ve COI dizileri ile karşılaştırılması

Türkiye-Kocaeli	**Örneğe ait ITS2 baz çifti sayısı**	**Tür**	**Karşılaştırılan ITS2 Erişim numarası**	**ITS2 % benzerlik oranları**	**Örneğe ait COI baz çifti sayısı**	**Karşılaştırılan COI Erişim numarası**	**COI benzerlik oranı %**
S66	323	*Cx. pipiens molestus*	KU495641.1	99,38	697	MG712551.1	96,02
		Cx.pipiens pipiens	DQ341109.1	99,38		KU756485.1	95,82
		Cx. pipiens	LC120318.1	99,38		MK047311.1	96,27
		Cx.quinquefasciatus	FJ416045.1	98,77		MG712557.1	96,01
S67	328	*Cx. pipiens molestus*	AJ850084.1	98,18	699	MG712551.1	100
		Cx.pipiens pipiens	DQ341109.1	98,17		KU756485.1	99,85
		Cx. pipiens	LC120317.1	98,17		KJ401311.1	100
		Cx.quinquefasciatus	FJ416045.1	97,56		MG712557.1	100
S68	324	*Cx. pipiens molestus*	AJ850085.1	100	697	MG712551.1	99,85
		Cx. pipiens	LC120318.1	100		KJ401311.1	99,85
		Cx.pipiens pipiens	DQ341109.1	100		KU756485.1	99,70
		Cx.quinquefasciatus	FJ416045.1	99,38		AB738257.1	100

4. TARTIŞMA

Ülkemizde yayılış gösteren sivrisinek türleri için ilk kayıtlar 1914-1970 yıllarında Türk bilim insanları ile Martini, Vogel ve Bentman gibi yabancı bilim insanlarının yaptıkları faunistik araştırmalardan elde edilmiştir (Merdivenci, 1984). Parrish (1959) tarafından ise 1958-1959 yıllarında 55 sivrisinek türü, Ramsdale ve diğerleri (2001) tarafından ise 50 sivrisinek türü tanımlanmıştır (Parrish, 1959; Ramsdale ve diğ., 2001).

Sivrisineklerde cins veya tür düzeyinde ayırım için pek çok tayin anahtarı mevcuttur. Böceklerde bu taksonomik anahtarlar gerek larva gerekse ergin evrelerine yönelik olarak kullanılmaktadır (Topluoğlu, 2016). Morfolojik özelliklere bakılarak yapılan geleneksel tür tanımlama yöntemleri bazı sivrisinek türleri için kolaylıkla ayırt edebilme gücüne sahipken bazı kardeş (sibling) türlerin ayırımında yetersiz kalmaktadır. Bunun için günümüzde geleneksel yöntemlere ek olarak moleküler tanımlama yöntemleri kullanılmaktadır. Sivrisinek popülasyonlarında yapılan bu genetik analizler hem epidemiyolojik hem de çeşitli patojenlerin vektör potansiyellerini belirleme ve risk faktörlerini ortaya çıkarmak amacıyla oldukça önemlidir (Şahingöz Demirpolat ve diğ., 2018). Genetik analizlerde en fazla yararlanılan DNA barkod genleri COI, 18S rDNA, 16S rDNA, ITS1 ve ITS2'dir. PZR ile amplifiye edilen gen bölgeleri sekanslandıktan sonra GenBank ve BOLD Systems gibi açık erişime sahip veritabanlarında eşleşen sekans verisinin bulunması durumunda örnekler, tür bazında tanımlanabilmektedir.

Bu çalışma Haziran 2017 ve Eylül 2018 tarihleri arasında Kocaeli sınırları içerisinde gerçekleştirilmiştir. 54 adet sivrisinek manuel olarak toplandı ve filogenetik analizle 4 cinse ait türler saptandı. DNA barkod geni olan COI ile tespit edilen 17 *Aedes* cinsi sivrisineğin 10 tanesinin *Ae. geniculatus*, 7 tanesinin ise *Ae. albopictus* olduğu belirlendi. 34 *Culex* cinsi sivrisineğin 33 tanesi *Cx. pipiens* kompleksi türleri, 1 tanesi ise *Cx. torentium* olarak saptandı. 2 adet *Anopheles* cinsi sivrisinekten biri *An. funestus* diğeri *An. plumbeus* olarak; bunların dışında bir tane *Cs. longiareolata* tespit edildi.

Aedes, *Anopheles* ve *Culex* cinsi sivrisineklerin pek çok önemli hastalık için vektör oldukları düşünüldüğünde bu sivrisineklere ait türlerin dağılımı ve epidemiyolojisi

üzerine detaylı bilgiye ihtiyaç olduğu görülmektedir (Şahingöz Demirpolat ve diğ., 2018). Türkiye'de sivrisinekler üzerine yapılan çalışmalar genellikle morfolojiye dayalı olmuştur (Korkmaz ve diğ., 2016). Buna rağmen son yıllarda sivrisineklerin türlerinin tespit edilmesi üzerine moleküler düzeyde de çalışmalar bulunmaktadır (Günay, 2015; Korkmaz ve diğ., 2016; Bişkin ve diğ., 2010; Çetin ve Yanıkoğlu 2004; Öter, 2014).

4. 1. *Culex pipiens* Kompleks Türleri

4.1.1. COI

Culex cinsine ait sivrisinekler Afrika, Avrupa, Asya, Amerika olmak üzere dünyada yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Yurdumuzda ise her iklim bölgesinde yayılım göstermektedir. *Cx. pipiens* insan yerleşim yerlerinde en çok bulunmalarına karşın larvaları büyük su birikintileri, dereler, göletler, sulama kanalları, lağım kuyuları, su depoları, uzun süre temizlenmemiş bahçe havuzları, her türlü atık, kirli sular, sucul habitatlar olmak üzere çok farklı habitatlarda yerleşim göstermektedirler (Muslu, 2009).

Kocaeli sınırlarında yaptığımız çalışmada *Culex* cinsine ait 2 tür belirledik. Bunlar *Cx. pipiens* ve *Cx. torrentium*. Bu iki tür, kardeş taksonlar olarak ifade edilmekte ve subtropik iklim kuşağı ve Palaearktik bölgede yayılış göstermektedir (Shaikevich ve diğ., 2016; Vinogradova ve diğ., 2007). Shaikevich ve diğerleri (2016) tarafından belirtildiğine göre *Cx. quinquefasciatus* tropikal bölgelerde yayılış göstermekte ve Avrupa'da bulunmamaktadır. Fakat Günay ve diğerleri (2015) tarafından *Cx. quinquefasciatus*'un Türkiye sınırlarında ilk kaydı sağlanmıştır.

Yaptığımız çalışmada 54 adet sivrisinekten 34'ü *Culex* cinsine ait türlerdi. Bunlardan 33 tanesini *Cx. pipiens* kompleksi sivrisinekler oluştururken sadece 1 tanesi *Cx. torrentium* türüne aitti. *Cx. pipiens* kompleksi türü sivrisinekler arasında *Cx. pipiens* form *molestus*, *Cx. pipiens* form *pipiens* ve *Cx. quinquefasciatus* türleri yer almaktadır. Morfolojik olarak ayırmanın güç olduğu bu sivrisinekler için çalışmamızın ilk aşamasında COI barkod genini kullandık. 34 adet COI dizimizin NCBI genom veri bankası BLAST uygulamasında *Cx. pipiens* kompleksinde yer alan *Cx. pipiens* form *molestus*, *Cx. pipiens* form *pipiens* ve *Cx. quiquefasciatus*'larla % benzerlik oranları Tablo 3.33'ten de görüleceği üzere çok yüksekti. Kanaatimizce COI barkod geni *Cx. pipiens* kompleksi türlerini ayırmada güçlü değildir. Nitekim Laurito ve diğerleri (2013) tarafından, Arjantin ve Brezilya'da *Culex* türleri üzerine COI geni kullanarak

yaptıkları araştırmalarında %69 oranında tür tanımı yapabildiklerini geriye kalanların ise ya belirlenemediklerini ya da yanlış tayin edildiğini belirtmişlerdir.

Türkiye'de *Cx. pipiens* kompleks üyelerinin genotiplendirilerek karakterizasyonlarının sağlandığı iki çalışmanın (Ergunay ve diğ., 2014; Günay ve diğ., 2015) varlığı gözükmektedir. Günay ve diğerleri (2015), Türkiye sınırlarında yayılış gösteren ve morfolojik analizlerle *Culex* cinsine ait olduğu belirlenen *Cx. (Barraudius) modestus, Cx. laticinctus, Cx. mimeticus, Cx. perexiguus, Cx. pipiens, Cx. pipiens* form *molestus* (Laboratuvar kolonisi olarak belirtilmiş)*, Cx. quinquefasciatus, Cx. theileri, Cx. torrentium, Cx. tritaeniorhynchus* ve *Cx. hortensis* türlerinin mitokondrial COI gen bölgesi ile barkodlamalarını ve karakterizasyonlarını yapmışlardır. Ayrıca Şahingöz Demirpolat ve diğerleri, Haziran-Ağustos 2014 tarihleri arasında Kayseri ilinden topladıkları sivrisinek örneklerinde *Cx. pipiens* kompleksi ve *Cx. torrentium* türünü moleküler olarak COI geni ile araştırmışlardır. Yaptıkları saha çalışmasında 1052 dişi sivrisinek örneklemesi yapmışlar ve bunlardan 315'i morfolojik olarak teşhis anahtarlarıyla analiz etmişlerdir. Çalışma sonucunda ACE-2 ve CQ11 mikrosatellit analizleriyle 311 örneğin *Cx. pipiens* form *pipiens* bant profilleri gösterdiklerini tespit etmişlerdir. Geriye kalan 4 örnek ise mikrosatellit analizleriyle *Cx. pipiens* form *pipiens* ve *Cx. pipiens* form *molestus* hibritleri olduklarını bulmuşlardır (Şahingöz Demirpolat, 2018).

Günay (2015) tarafından belirtildiğine göre, *Cx. pipiens,* ve *Cx. torrentium* kardeş türlerdir ve ülkemizde bulunan bu türler morfolojik olarak biribirine çok benzemektedir. Bu yüzden teşhis yapılırken dikkat edilmesi gerekmektedir. Moleküler olarak COI geni ile tespit ettiğimiz *Cx. torrentium (S25-MH463062*), Günay ve diğerleri (2015) elde ettikleri *Cx. torrentium* türleriyle karşılaştırıldığında (KJ012236, KJ012242 ve KJ012238) benzerlik oranının %100, aynı şekilde farklı ülkelerden veri bankalarına kaydedilmiş *Cx.torrentium* örnekleriyle (KJ401313.1 (Danimarka), HF562557.1 (Almanya), KU756484.1 (Avusturya) ve MH807265.1 (Avusturya)) karşılaştırıldığında benzerlik oranlarının %99,84-%100 arasında ve oldukça ayırt edici olduğu bulundu. Tablo 3.33 incelendiğinde S25 örneğimize ait COI dizisi HE997145.1 erişim numaralı *Cx.torrentium* ile %100 benzerlik oranına sahipken bunu MK047311.1 erişim numaralı %97,38 ile *Cx. pipiens* kompleksi üyeleri izlemektedir*. Cx.torrentium* için COI barkod geni oldukça ayırt edicidir.

Cx. pipiens alt türlerinin moleküler olarak teşhis edilmesi için bir çalışmada mikrosatellit CQ11 bölgesinde bulunan TG dinükleotid tekrar sayıları

karşılaştırılmıştır (Shaikevich ve diğ., 2016). Ancak Kuzey Amerikada yapılan bu çalışmada *Cx. torrentium* türü bulunmadığından *Cx. pipiens* s.s., *Cx. pipiens* f. *molestus* ve *Cx. quinquefasciatus* için ayırıcı olmuştur. Ancak İngiltere'de yapılan bir başka çalışmada COI DNA barkod geni ve CQ11 bölgesi ile *Culex* cinsinde yukarıda bahsedilen türler için teşhisi yapmanın yetersiz kalacağı rapor edilmiştir ve bu nedenle Avrupa'da tarama yapmak için bu genlerin kullanılamayacağı gösterilmiştir (Danabalan ve diğ., 2012).

4.1.2. ITS2

Ribozomal DNA'ların ITS2 ve mitokondrial COI geninin sekansları sivrisineklerin de dahil olduğu pek çok organizma için filogenetik ilişkileri anlamak ve genetik varyasyonları tayin etmek için kullanılan en popüler belirteçlerdir (Koosha ve diğ., 2017). Yaptığımız çalışmada COI barkod geni *Cx. pipiens* kompleksine ait kardeş türlerin ayırımında yeterli bulunamadı. Bu nedenle 5.8S rDNA ve 28S rDNA gen bölgelerine ait primerler ile arada kalan bir bölge olan ITS2 geni dizilenerek *Culex* türleri NCBI-BLAST üzerinden tekrar kontrol edildi.

Çalışmamızda ITS2 sekansları farklı türler için farklı bant uzunlukları vermiştir (Şekil 3.11). Literatürden elde edilen bilgiye göre ribozomal DNA'ya ait bu bölgelerde görülen insersiyon/delesyonlar nedeniyle hızlı bir tür ayrımı yapmak mümkündür. Bu nedenle ITS1 ve ITS2 bölgeleri hem Anofel hem de *Culex* için filogenetik tür ayırımı çalışmalarında kullanılmaktadır (Topluoğlu 2016; Miller ve ark, 1996; Linton ve ark, 2002). Ancak 34 *Culex* türünden yine yalnızca S25 nolu sivrisinek örneğimiz, COI için %100 benzerlik oranı ile *Cx. torrentium* olarak tespit edildi. Aynı örneğimiz *Cx. pipiens* kompleksi ile %97,38, *Cx. quinquefasciatus* ile %97,37 benzer bulundu. Tablo 3.33 incelendiğinde S25 ITS2 için %97,40 AJ850083.1 erişim numaralı *Cx. torrentium* ile benzer bulunurken *Cx. pipiens* komplexi türlerle %87-%88 arasında benzerlik oranına sahip olduğu tespit edildi. S25'in dışındaki diğer *Culex* örneklerimiz ITS2 gen dizisi açısından incelendiğinde *Cx.pipiens* form *pipiens*, *Cx. pipiens* form *molestus* ve *Cx. quinquefasciatus* sivrisinekleri ile yüksek benzerlik oranlarına sahip olduğu görüldü (Tablo 3.33).

Şekil 3.11 incelendiğinde elde ettiğimiz çalışmamızda tespit ettiğimiz 4 cins için ITS2'nin farklı bant büyüklüklerinde olduğu görülmektedir. Bu durum ITS2'nin uzunluk varyasyonlarının bir sonucudur. Koosha ve diğerlerine (2017) göre ITS2 segmentinin baz uzunluğu 326-356 baz çifti arasında değişirken, 5.8S ve 28S ribozomal alt ünitelerin uzunluğu türler arasında korunmuştur ve bu durum ITS2'nin

PZR ürünlerinde hafif uzunluk polimorfizmine yol açmıştır. Hizalamalardan sonra 5.8S-ITS2-28S segmenti 41 substitüsyon ve 48 indel (insersiyon-delesyon) içeren 478 bp lik uzunlukla sonuçlanmıştır. GenBank'a kaydı sağlanan örneklerin bu önemli tür içi polimorfizmlerinin kısmen ITS2 gen bölgesinde mikrosatellit tekrarlarının 11 varyasyonu nedeniyle olabileceğini öne sürmüşlerdir (Koosha ve diğ., 2017).

Cx. pipiens kompleksi taksonomik genetik çalışmalar açısından çok yakın ilişkili sivrisineklerden oluşan bir gruptur (Miller ve ark 1996). Miller ve diğerlerinin (1996) belirttiğine göre hem ITS1 hem de ITS2 gen bölgeleri sivrisinek türleri arasında önemli boyutta heterojenite göstermektedir. Bu heterojenite *Culex* türleri arasında %41 oranında bir nükleotidlik Gap'lar, %21 oranında 10 nükleotid ya da daha büyük Gap'ları yansıtmaktadır. Ayrıca aynı araştırmacıların yaptıkları çalışmalarında ITS1'in %16'sı baz substitüsyonlarını ve insersiyon/delesyonları içerdiğini, bu oranın ITS2'de %8 olduğunu bildirmişlerdir. ITS1'deki varyasyonların %50'si, ITS2'dekilerin ise %35'i insersiyon/delesyon olayları nedeniyledir.

Kriptik (Cryptic) türler, morfolojik özelliklerine bakılarak ayırmanın mümkün olmadığı ya da zor olduğu yakın ilişkili türlerdir. Bu kompleks türler eklembacaklıların geniş bir grubunda bilinmekte ve iyi çalışılmış tıbbi önemi olan böcekler arasında ortaktır. Örneğin malarya parazitlerini taşıyan birkaç anofel kriptik tür komplekslerinin üyesidir. Bu kompleks türleri tayin etmek için allozime dayalı teknikler ya da politen kromozom insersiyonları yaygın olarak kullanılmaktadır (Collins ve Paskewits, 1996). Moleküler düzeyde tür tayini için DNA temelli metodlar olarak mitokondrial ve histonlar, 5S DNA genleri ve ribozomal DNA (rDNA) gibi tandem tekrarlı nüklear gen aileleri kullanılmaktadır. IGS (integenic spacers)'ler, büyük ribozomal DNA altünite genleri olan 18S, 5.8S ve 28S alt üniteleri böceklerde tercih edilen bölgelerdir. ITS1 ve ITS2 (internal transcribed spacers) bölgeleri, yüksek taksonomik düzeylerde korunmuş dizileri içeren rDNA kodlayan bölgeler arasında bulunmaktadır. Bu bölgeler kriptik türleri arasında farklılıkları ortaya koymak amacıyla PZR ile çoğaltılabilir, restriksiyon enzimlerle kesilebilir veya sekans analizi yapılabilir. Collins ve Paskewits'in (1996) belirttiğine göre yapılan çalışmalar Anofel türlerine ait ITS2 gen bölgesinin iki özelliğini ortaya koymuştur. Birincisi bu bölgeler genellikle PZR amplifikasyonunda 1 kb'den daha kısa ve korunmuş bölgelerdir. En kısa ITS2 gen dizisi 305 bp ile *An. hermsi*, en uzun ise 700 bp ile *An. farauti* bulunmuştur. İkinci özelliği ise ITS2 dizilerinde PZR bantları incelendiğinde bile görüleceği üzere tür içi (intraspecies) varyasyonlar, türler arası (interspecies) varyasyonlardan daha düşüktür. Yine aynı araştırmacıların notlarına göre örneğin *An. freeborni*'nin dört

farklı coğrafik izolatlarından elde edilen dokuz farklı ITS2 klonu incelenmiş. *An.quadrimaculatus* kompleks türlerinin ITS2 dizilerinde de intraspesifik varyasyonun benzer düşük düzeyleri bulunmuştur (Collins ve Paskewits, 1996).

Koosha ve diğerleri (2017), *Culex* türleri arasında coğrafi dağılımla ilişkili olarak C, T ve H olmak üzere 3 haplotip belirlediler. C haplotipi tropikal ya da tropik-ılımlı bölgelerde bulunurken, H/T haplotipi dünyada ılımlı bölgelerde bulunmaktadır. Afrika ve Hindistan gibi tropikal bölgelerde *Cx. quinquefasciatus* dominanttır. Kendi yaptıkları çalışmadan çıkan verilere göre ise Haplotip C *Cx. quinquefasciatus* ile sınırlı değildir ve aynı haplotip diğer *Culex* üyelerinde de bulunmaktadır. Bu durum *Culex*'in bazı üyelerinin yakın coğrafik dağılımı ile açıklanabilir. Iran'ın güney bölgeleri tropikal iklime sahiptir ve *Cx. quinquefasciatus* dominanttır ve Haplotip C'yi yansıtır. Bu haplotip ayrıca ılıman iklime sahip Türkiye ve Arjantin'de de bulunmuştur. Yeni dünyada (Amerika ve Kanada), Japonya ve Avustralya'da Haplotip H bulunmuştur. Bu ara Haplotip Rusya ve Almanya'da da görülmüştür. Haplotip H, *Cx. pipiens*, *Cx. pipiens* f. *molestus*, *Cx. pipiens* f. *pipiens*, *Cx. quinquefasciatus*, ve *Cx. pipiens pallens*'i içine almaktadır. Haplotip T, ılıman kuşakta bulunan Haplotip C'ye göre daha az frekansa sahiptir ve Avrupa'nın bazı yerlerinde (Rusya ve Almanya) *Cx. p.* form *molestus* olarak rastlanmıştır. Akdeniz Bölgesi (Türkiye)'nde *Cx. pipiens*, İran'da ise *Cx. quinquefasciatus* olarak bulunmuştur. *Cx. pipiens* topluluğunun üyelerinin popülasyon genetiği yapısının şekillenmesi iklim kuşakları ile ilgilidir (Koosha ve diğ., 2017).

4.2. Aedes

S1, S2, S4, S5, S6, S7, S52, S53, S54, S55 olarak adlandırdığımız sivrisinek örnekleri NCBI'da kayıtlı türlerle karşılaştırıldığında *Ae. geniculatus* (KM258304.1) ile benzerliği %99-%100 arasında olduğu tespit edilirken, *Ae. japonicus* (FJ641869.1) ile %85,9-%87,1, *Ae. notoscriptus* (MG242508.1) ile %88,9-%89,9 benzerlik gösterdiği bulundu. Ergin öncesi dönemlerde ağaç kovuklarında biriken sularda uyum sağlayan (Günay, 2015), daha önce Türkiye'de Antalya, Bursa, Rize, Samsun, Edirne ve Kırklareli'nde kaydı sağlanan *Ae. geniculatus* (Şahin 1984, Günay 2015, Şakacı, 2018) bu çalışma ile de Kocaeli'de COI gen bölgesi ile moleküler düzeyde tespit edildi.

S42, S58, S61, S62, S63, S64, S65 olarak isimlendirdiğimiz sivrisinek örneklerine ait COI gen dizileri, MH817529.1 erişim numaralı *Ae. albopictus* ile karşılaştırıldığında %99,8-%100 oranında; *Ae. japonicus* (FJ641869.1) ile %85, *Ae. notoscriptus*

(MG242508.1) ile %84-%85 benzerlikler gösterdi. Genetik uzaklıklar açısından incelendiğinde *Ae. geniculatus* örneklerimiz arasında %0,02-%1,7 arasında yüksek benzerlik olduğu görüldü. Bu değer dış gruplar olan *Ae. geniculatus* ile %1,4, *Ae. japonicus* ile %9,9, *Ae. notoscriptus* ile %8 olarak bulundu (Tablo 3.4).

Asya Kaplan Sivrisineği olarak anılan *Ae. albopictus*, Dengue ateşi, Zika virisü, japon ensefelati, Sarı ateş, Batı at ensefaliti, Venzuella at ensefaliti gibi yaklaşık 32 virüsü yayma potansiyeline sahiptir (Şakacı, 2018). Stegomyia aitcinsine ait bu sivrisinek türü önemli vektör türleri barındırmaktadır. Son yıllarda Avrupa, Amerika ve Güneydoğu Asya ülkelerinde hızla yayılmış ve arboviral hastalıkların taşınmasına neden olmuştur. Deng humması ve chikungunya hastalıklarına neden olan *Ae. albopictus*'un İtalya örneklerinde ise USUTU virüsü tespit edilmiştir (Günay, 2015).

Ae. albopictus, ilk kez Avrupa'da 1979'da Arnavutluk ve 1990 tarihinde ise İtalya'da saptanmıştır. Günümüzde Balkanlar olmak üzere, Malta, Almanya, İtalya, Fransa, İspanya, İsviçre, Rusya, Gürcistan ve Lübnan, İsrail, Suriye, Suudi Arabistan ve Yemen'i içine alan Ortadoğu ülkelerinde tespit edilmiştir. Ülkemizde ise Doğu Karadeniz (Akiner, 2016), Trakya'nın Karadeniz kıyıları ve İstanbul'un Avrupa yakasında bazı semtlerde saptanmıştır (Günay, 2015; Şakacı, 2018).

Öter ve Tüzer, 2014'de yayınladıkları makalelerine göre 2003-2004 tarihlerinde İstanbul'da bulunan sivrisinek türlerinin kompozisyonlarını belirlemek üzere morfolojiye dayalı olarak yaptıkları çalışmalarında, larva ve pupalardan yetiştirdikleri 1085 dişi sivrisineğin 992 sinin *Cx. pipiens*, 32'sinin *Cs. longiareolata*, 22'sinin *An. maculipennis*, 18'inin *An. claviger*, 13'nün *Cs. annulata*, 3 tanesinin *Ae. vexans*, 3'nün *Cx. hortensis* ve 2'sinin Ochlerotatus olduklarını tespit etmişlerdir (Öter ve Tüzer, 2014). Yine Öter ve diğerleri (2013) Türkiye'de ilk defa Trakya Bölgesinde Keşan ve İpsala'da *Ae. albopictus* türü için DNA barkodlama yöntemi ile tanımlama yapmışlardır (Öter ve ark 2013).

4.3. Anopheles

Çalışmamızda elde ettiğimiz COI dizilerinden S19 örneğimizin *An. funestus* (MH463063), diğer bir örneğimiz S9'un ise *An. plumbeus'*a ait olduğu tespit edildi. S19 örneğimiz NCBI'da kayıtlı *An. funestus* (MK300231.1, MK300232.1, KJ522832.1, MH299888.1) türleri ile en yüksek oranda benzerlik gösterdiği (%88), bu oranı %83 ile *An. eiseni* (MF172271.1) ve *An. annulipes* (MG712534.1) ve %82 ile *An. darlingi* (JF923693.1) takip ettiği görüldü.

An. plumbeus (S9) örneğimiz COI geni için KM258215.1 erişim numaralı *An. plumbeus* ile %100 benzerlik gösterirken *An. eiseni* (MF172271.1), *An. darlingi* (JF923693.1) ve *An. annulipes* (MG712534.1) ile %88 oranında benzerlik gösterdi.

Şanlıurfa' da yapılan bir araştırmada *Anopheles* türlerinin ayrımında ITS2 sekanslarındaki farklılıklar incelenmiş, üreme alanlarından toplanan larva örneklerinin baskınlık indeksinde *An. sacharovi* türünün *An. superpictus* türüne baskınlık gösterdiği belirlenmiştir (Topluoğlu, 2016). *An. sacharovi* türünün ülkemizde en önemli sıtma vektörü olduğu da bilinmektedir (Alten ve diğ., 2000; Erel, 1973; Merdivenci, 1984; Kasap ve diğ., 1989).

An. sacharovi'den sonraki en önemli sıtma vektörü ise *An. superpictus* türü sivrisineklerdir. *An. superpictus*'un sıtma yayılmasındaki epidemiyolojik rolü, Ekzofilik ve zoofilik yönelimlerinden dolayı, yerel duruma göre farklılık göstermektedir (Postiglione ve diğ., 1973; Merdivenci, 1984; Alten ve Çağlar, 1998; Alten ve diğ., 2000).

Anopheles cinsi sivrisineklerin ülkemizde sıtma dışında herhangi bir hastalığa vektörlük ettiğini ispatlayan bir yayın bulunmamaktadır (Topluoğlu, 2016).

An. plumbeus, Avrupa'da (uzak kuzey bölgeleri hariç), Orta Doğu ve Kuzey Afrika'da yaygın olarak dağılmış Palearktik bir türdür (Schaffner ve diğ., 2012). Ormanlık alanlarda deniz seviyesinden 1200 m'ye kadar bulunabilir (Senevet ve diğ., 1956). Bu tür sıtma iletim döngülerindeki rolü nedeniyle önem kazanmıştır (Schaffner ve diğ., 2012). Özellikle deneysel enfeksiyonlarda (Schaffner ve diğ., 2012; Marchant ve diğ., 1998; Eling ve diğ., 2003). *Plasmodium falciparum*'a karşı duyarlılığı ve *Plasmodium* parazitlerinin gelişimlerini oosit ve sporozoit aşamalarına tamamlamalarını sağlayan uzun ömürlülüğü (Schaffner ve diğ., 2012), potansiyel sıtma vektörü olarak uygun kılmaktadır (Krüger ve diğ., 2001). Ayrıca, insan yapımı yapay üreme habitatını ve antropofilik davranışını kullanma yeteneği, yakın zamanda Belçika'da (Dekoninck ve diğ., 2011) bildirildiği gibi, halk sağlığı riskinde potansiyel sonuçları olan populasyonunu ve verdikleri rahatsızlığı artırabilir. Ayrıca, *An. plumbeus*, *Plasmodium vivax*'ın sporozoitlerini de üretebilir (Blacklock B., Carter HF., 1919; Shute PG., Indigenous P., 1954) ve Schaffner ve arkadaşları 2001 yılında ve Vermeil ve arkadaşları 1960 yılında yaptıkları araştırmalarda, Batı Nil virüsü veya hatta dirofilariasis'in korunmasında önemli bir rol oynayabileceğini bildirmiştir.

4.4. Culiseta

Cs. longiareolata NCBI BLAST'tan yaptığımız analiz sonuçlarına göre erişim numarası JQ388785.1, MK170087.1 ve HG931139.1 olan örnekler ile %99,69-%99,85 oranında benzer çıktı. Benzerlik oranları ardından gelen sıralamaya göre %91 *Cx. erythrothorax* ve *Cx. pipiens*, %90,78 ile *Cx declarator*, *Cx. vagans* ve *Cs. inornata* takip etti.

Günay tarafından 2015 yılında yapılan bir tez çalışmasında, farklı şehirlerden elde edilen Allotheobaldia altcinsine ait Cs. Longieraolata türüne ait sivrisinekler çalışılmış ve bu türe ait 13 haplotip saptanmıştır.

Cs. longaireolata da *Culex* cinsi sivrisineklerle benzer habitatlarda bulunmasına rağmen ayrıca bataklıklar, fosseptikler, drenaj kanalları gibi pek çok alanda yerleşim gösterebilirler. Zoofil olduğu bilinmekle beraber nadiren insan kanı ile de beslenmektedir (Muslu, 2009).

Cs. longiareolata, bruselloz, kuş gribi ve Batı Nil ensefaliti için bir vektördür (Maslov, 1967). Larvaları hafif tuzlu suya ve yüksek derecede kirliliğe toleranslıdırlar (Becker ve diğ., 2003).

Cs. longiareolata larvaları çoğunlukla su yüzeyinde bulunurlar. Pupa evresinde ise suyun dibinde hareket etmeden uzun süre durabilmektedirler. *Cs. longiareolata*'nın bazı populasyonlarında otojeni (kan emmeden yumurta bırakabilme) gözlenmiştir (Becker ve diğ., 2003). *Cs. longiareolata*, kuşlarda görülen kan parazitlerinin vektörü olarak da bilinmektedir. Kuşlarda görülen sıtmanın eşeyli üremesinin evreleri bu sivrisinekte izlenebilir (Merdivenci, 1984).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Türkiye Kocaeli ilinde rastgele toplanan 54 sivrisinek örneği laboratuara getirilerek DNA izolasyonları yapıldı. İzole edilen sivrisinek DNA'ları, DNA barkod genleri olan COI ve ITS2 gen bölgelerine ait primerlerle çoğaltılıp ardından her iki gen bölgesine ait DNA dizileri çıkarıldı. Çalışma sonucunda aşağıda görülmekte olan Tablo 5.1 ortaya çıktı.

Çalışmamızın ilk aşamasında COI barkod geni kullanıldı. Mitokondrial COI geni *Aedes*, *Anopheles* ve *Culiseta* türleri için yüksek bir ayırım gücüne sahipken *Culex*'te aynı başarıyı göstermedi. *Culex* türlerinden yalnızca bir *Cx. torrentium* için etklili bir oranda sonuç elde edilirken geriye kalan 33 örnekte *Cx. pipiens* kompleksi türlerini ayırmada başarılı olamadı. Bu nedenle çalışmamızın ikinci aşamasında ITS2 barkod geni denendi. Ancak ITS2 gen dizisi de COI gibi *Cx. pipiens* kompleksi türleri olan *Cx. pipiens* form *pipiens*, *Cx. pipiens* form *molestus* ve *Cx. quinquefasciatus* ayırmada etkili olamadı ve BLAST uygulamasında kayıtlı türlerle yakın benzerlik oranları gösterdi (Tablo 3.33).

Vektör sivrisineklerin moleküler düzeyde, tür bazında kesin teşhis edilmesi için hangi barkod genlerinin kullanılması gerektiğinin bilinmesi, pratik bilgiye daha kolay ulaşmamızı sağlayacaktır. Ancak çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara bakıldığında COI ve ITS2 barkod genleri *Cx. pipiens* kompleksi türlerini ayırmada güçlü barkod genleri olmadıkları görüldü. Özellikle bu komplekse ait sivrisinek türlerinin filogenetiğini çalışmak isteyen araştırmacılara nükleer genlerden IGS (Intergenic Spacer), ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1), mitokondriyal protein kodlayan bölgelerden ND1 (NADH dehydrogenase 1), ND2 (NADH dehydrogenase 2), COII (Cytochrome Oxidase Subunit 2), Cytb (cytochrome b apoenzyme) genlerinin analiz edilmesini önermekteyiz (Hwang ve Kim, 1999).

Tablo 5.1. Kocaeli sınırları içinde yaygınlık gösteren sivrisineklere ait türler

Cins	**Tür**	**Adet**
Aedes	geniculatus	10
	albopictus	7
Anopheles	funestus	1
	plumbeus	1
Culex	pipiens kompleksi	33
	torrentium	1
Culiseta	longiareolata	1
Toplam		54

KAYNAKLAR

Akiner MM., Demirci B., Babuadze G., Robert V., Schaffner F., Spread of the Invasive Mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the Black Sea Region Increases Risk of Chikungunya, Dengue, and Zika Outbreaks in Europe, *PLoS Negl Trop Dis*, 2016, **10**(4), 1-5.

Aldemir A., Ankara Gölbaşı'nda Sivrisineklere Karşı Entegre Mücadele, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi,Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2003, 131098.

Alptekin, D., Kasap, H., Çukurova'da Sık Bulunan (Diptera: Culicidae) Türlerinin Ergin Öncesi Evrelerinin Bulunduğu Habitatlar ve Bu Habitatların Önemli Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri, *Tr. J. of Zoology*, 1997, **21**(1), 1-6.

Alten B., Boşgelmez A., Muğla İli, Ortaca ve Dalaman Yörelerinde Bulunan *Culex* (Diptera: Culicidae) Türlerinin Biyo-Ekolojisi Üzerine Araştırmalar, *Tr. J. of Zoology*, 1996, **20**, 27-51.

Alten B., Çağlar S.S., Özer N., Malaria and Its Vectors in Turkey, *Mosquito Bulletin*, 2000, **7**, 27-33.

Alten B., Çağlar S.S., *Vektör Ekolojisi ve Mücadelesi*, T.C.Sağlık Bakanlığı Sağlık Projesi Genel Koordinatörlüğü, Bizim Büro Basımevi, Ankara, 1998.

Alten B., Muğla İli, Ortaca ve Dalaman Yörelerinde *Culex* Türlerinin (Diptera: Culicidae) Biyo-Ekolojisi Üzerine Araştırmalar, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1993, 28298.

Bagirov G.A., Alirzaev G.U., Zinov'eva A.F., Abdullaeva R.A., Kasumova Z.B., Effect of Changes in the Ecological Contidions on the Blood-Sucking Mosquito Fauna of Baku and the Apsheron Peninsula, *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni*, 1986, **1**, 16-18.

Baldwin B. G., Markos S., Phylogenetic Utility of The External Transcribed Spacer (ETS) of 18S-26S rDNA, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 1998, **10** (3), 449-463.

Baldwin B. G., Phylogenetic Utility of The Internal Transcribed Spacers of Nuclear Ribosomal DNA in Plants: an Example from The Compositae, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 1992, **1**(1), 3-16.

Baldwin B. G., Sanderson M. J., Porter J. M., Wojciechowski M. F., Campbell C. S., Donoghue M. J., The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: a Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny, *Ann. Mo. Bot. Gard.*, 1995, 247-277.

Becker N., Petric D., Zgomba M., Boase C., Dahl C., Lane J. ve diğ., *Mosquitoes and Their Control*, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2003.

Becker N., Petric D., Zgomba M., Boase C., Dahl C., Madon M., Kaiser A., *Mosquitoes and Their Control*, 2nd Edition. Springer Heidelberg Dordrecht London New York, 2010.

Bedir H., Aras Vadisi Sivrisineklerinin (Diptera: Culicidae) Tür Kompozisyonu ve Saldırı Periyotları, Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars, 2008, 246349.

Bentley M.D., Day J.F., Chemical Ecology and Behavioral Aspects of Mosquito Oviposition, *Ann Rev.Entomology*, 1989, **34**(1), 401-421.

Bişkin Z., İnci A., Yıldırım A., Düzlü Ö., Kayseri'nin Felahiye Yöresinde Yaygınlık Gösteren Sivrisinek (Diptera: Culicidae) Türleri, Sağlık *Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences)*, 2010, **19**(2), 133-139.

Blacklock B., Carter H.F., The Experimental Infection, in England, of *Anopheles plumbeus*, Hal., with *Plasmodium vivax* (Sporozoites in Salivary Glands.). Preliminary Note, *Ann Trop Med Parasitol*. 1919, **13**(2), 187–188.

Boşgelmez A., Çakmakçı L., Alten S.B., Ayaş Z., Işık K., Sümbül H., Kuytul A., Kocal A., Kaynaş S., Temimhan M., Şimşek F.M., *Sivrisineklere Karşı Entegre Mücadele*, T.C. Turizm Bakanlığı Yatırımlar Genel Müdürlüğü Altyapı Dairesi Başkanlığı, Yayın No: 1994-1, 759 s.

Clements A.N., *Physiology of Mosquitoes*, 1st. Edition, Pergamon Pres Ltd., London, 1963.

Collins F. H., Paskewittz S.M., A Review of the Use of Ribosomal DNA (rDNA) to Differentiate Among Cryptic *Anopheles* Species, *Insect Molecular Biology*, 1996, **5**(1), 1-9.

Cox A.J., Hebert P.D.N., Colonization, Extinction and Phylogeographic Patterning in a Freshwater Crustacean, *Molecular Ecology*, 2001, **10**(2), 371-386.

Çetin H., Yanıkoğlu A., Antalya Kentinde Bulunan Sivrisinek (Diptera: Culicidae) Türleri, Üreme Alanları ve Baskın Tür *Culex pipiens* L.'in Bazı Özellikleri, *Türkiye Entomoloji dergisi*, 2004, **28**(4), 283-294.

Danabalan R., Ponsonby D. J., Lintoni Y.-M., A Critical Assessment of Available Molecular Identification Tools for Determining the Status of *Culex pipiens* s.l. in the United Kingdom, *Journal of the American Mosquito Control Association*, 2012, **28**(4s), 68–75.

Dekoninck W., Hendrickx F., Van Bortel W., Versteirt V., Coosemans M., Damiens D., ve diğ., Human-Induced Expanded Distribution of *Anopheles plumbeus*, Experimental Vector of West Nile Virus and A Potential Vector of Human Malaria in Belgium, *J Med Entom*. 2011, **48**(4), 924–928.

Eling W., van Gemert G.J., Akinpelu O., Curtis J., Curtis C.F., Production of *Plasmodium falciparum* Sporozoites by *Anopheles plumbeus*, *Eur Mosq Bull*., 2003, **15**, 12–13.

Erel D., *Anadolu Vektörleri ve Mücadele Metotları*, T.C. Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı Hıfzıssıhha Okulu, Yayın No: 47, Ankara. 1973.

Ergunay K, Gunay F, Erisoz Kasap O. ve diğ., Serological, Molecular and Entomological Surveillance Demonstrates Widespread Circulation of West Nile Virus in Turkey, *PLoS Negl Trop Dis*, 2014, **8**(7), e3028.

European Centre for Disease Prevention and Control, *Guidelines for the surveillance of native mosquitoes in Europe*, Stockholm: ECDC, 2014, ISBN 978-92-9193-599-4.

Felsenstein J., Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap, *Evolution (N. Y),* 1985, **39**(4), 783–791.

Gaffigan T. V. ve Ward R. A., Index to the Second Supplement to "A Catalog of the Mosquitoes of the World" (Diptera: Culicidae)*,* with Corrections and Additions, *Mosquito Systematics*, 1985, **17**(1), 52-63.

Günay F., Alten B., Simsek F. ve diğ., Barcoding Turkish *Culex* mosquitoes to Facilitate Arbovirus Vector Incrimination Studies Reveals Hidden Diversity and New Potential Vectors, *Acta Trop*, 2015, **143**, 112-120.

Günay F., Türkiye Sivrisinek Faunası Üzerine DNA Barkodlama Yöntemiyle Moleküler Analizler, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2015, 392734.

Hasan A.U., Suguri S., Ahmed S.M., Fujimoto C., Harada M., Rahman S.M., Zaman R.U., Kakehi Y., Molecular Phylogeography of *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes in Central Bangladesh, *Acta. Trop.*, 2009, **112**(2), 106-114.

Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R., Biological identifications through DNA barcodes, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological sciences*, 2003, **270**(1512), 313-321.

Hwang U.W., Kim W., General Properties and Phylogenetic Utilities of Nuclear Ribosomal DNA and Mitochondrial DNA Commonly Used in Moleculer Systematics. *The Korean Journal of Parasitology*, 1999, **37**(4), 215-228.

İpek E., Tekirdağ'da *Culiseta* spp.'nin Aylık Üreme Karakteristiğinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ, 2016, 436435.

J. Abul-Hab, S. Abdul-Latif, N.H. Hasani, J.A. Hab, S.A. Latif, Seasonal Occurence of Culicinae (Diptera: Culicidae) in Central in Iraq, *Journal of Biological Science Research*, 1986, **17**(1), 85-97.

James M. T. ve Harwood R. F., *Herms's Medical Entomology.*, 6th ed., Macmillan Publishing Co., Inc., New York, 1969.

Kasap M., Demirhan O., *Anopheles sacharovi*'de Beslenme ve Fizyolojik Yaş, *Çukurova Üniversitesi Tıp Fak.Der.*, 1989, **4**, 581-589.

Keskin E., Atar H.H., DNA Barkodlama: Mitokondriyal COI Geni Kullanılarak Moleküler Tanımlama. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi,* 2013, **6** (2), 01-08.

Kettle D. S., *Medical and Veterinary Entomology*., 2nd ed., CAB International, Wallingford, UK, 1995.

Knight K. L. ve Laffoon J. L., A Mosquito Taxonomic Glossary V. Abdomen (Except Female Genitalia), *Mosquito Systematics,* 1971, **3**(1), 8-24.

Knight K. L. ve Stone A., *A Catalog of the Mosquitoes of the World (Diptera: Culicidae)*, (2nd ed.), The Thomas Say Foundation Vol. 6., The Entomological Society of America, Maryland, 1977.

Knight K. L., *Supplement to "A Catalog of the Mosquitoes of the World" (Diptera: Culicidae)*, The Thomas Say Foundation Vol. 6 (supplement). The Entomological Society of America, Maryland, 1978.

Knowlton N., Weigt L.A., New Dates and New Rates for Divergence Across the Isthmus of Panama. *Proceedings of the Ro-yal Society of London. Series B*, 1998, **265**(1412), 2257-2263.

Koosha M, Oshaghi M.A., Sedaghat M. M., Vatandoost H., Azari-Hamidian S., Abai M.R., Hanafi-Bojd A. A., Mohtarami F., Sequence Analysis of mtDNA COI Barcode Region Revealed Three Haplotypes Within *Culex pipiens* Assemblage, *Experimental Parasitology*, 2017, **181**, 102-110.

Korkmaz S., Yıldırım A., Düzlü Ö., Çiloğlu A., Önder Z., İnci A., Kayseri Yöresinden Toplanmış *Culex* pipiens Komplekse Ait Sivrisinek (Diptera: Culicidae) Örneklerinin Kan Beslenme Identifikasyonu, *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2016, **40**, 199-204.

Krüger A., Rech A., Su X.Z., Tannich E., Two Cases of Autochthonous *Plasmodium falciparum* Malaria in Germany With Evidence for Local Transmission by Indigenous *Anopheles plumbeus*, *Trop Med Int Health*, 2001, **6**(12), 983–985.

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K., MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, **35**,1547-1549.

Laboudi M., Faraj C., Sadak A., Harrat Z., Boubidi S.C., Harbach R.E., EL Aouad R., Linton Y.M., DNA Barcodes Confirm the Presence of A Single Member of the *Anopheles maculipennis* Group in Morocco and Algeria: *An. sicaulti* is conspecific with *An. labranchiae*, *Acta Tropica,* 2011, **118**(1), 6-13.

Laurito M., Oliveira T. Mp., Almirón W.R., Sallum M.A.M., COI Barcode Versus Morphological Identification of *Culex* (*Culex*) (Diptera: Culicidae) Species: A Case Study Using Samples From Argentina and Brazil, *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 2013, **108**, 110-122.

Linton Y.M., Smith L., Harbach R.E., Observations on the Taxonomic Status of *Anopheles subalpinus* Hackett & Lewis and *An. melanoon* Hackett, *European Mosquito Bulletin*, 2002, **13**, 1-7.

Marchant P., Eling W., van Gemert G.J., Leake C.J., Curtis C.F., Could British Mosquitoes Transmit falciparum malaria?, *Parasitol Today*. 1998, **14**(9), 344–345.

Marshall J.F., *The British Mosquitoes*, 1st. Edition, British Museum, London, 1938.

Marquardt W. C., *Biology of Disease Vectors*, 2nd. Edition, Elsevier Academic Press,141 – 151, 2004.

Maslov A.V., *Bloodsucking Mosquitoes of the Subtribe Culisetina (Diptera, Culicidae) in World Fauna*, Vol. 81, No. 52003, Smithsonian Institution Libraries, Washington DC, 1989.

Merdivenci A., 1984. *Türkiye Sivrisinekleri (Yurdumuzda Varlığı Bilinen Sivrisineklerin Biyo-Morfolojisi, Biyo-Ekolojisi, Yayılışı ve Sağlık Önemleri)*, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, Rektörlük No: 3215 Dekanlık No: 136, TAŞ Matbaası, İstanbul.

Merritt R.W., Dadd R.H., Walker E.D., Feeding Behavior, Natural Food, and Nutritional Relationships of Larval Mosquitoes, *Annu. Rev. Entomology*, 1992, **37**(1), 349-376.

Miller B.R., Crantree M.B., Savage H.M., Phylogeny of Fourteen *Culex* Mosquito Species, Including the *Culex pipiens* Complex, Inferred From the Internal Transcribed Spacers of Ribosomal DNA, *Insect Molecular Biology*, 1996, **5**(2), 93-107.

Morçiçek B., Gocmen Taskin B., Doğaç E., Doğaroğlu T., Taskin V., Evidence of Natural Wolbachia Infections and Molecular Identification of Field Populations of *Culex pipiens* Complex (Diptera: Culicidae) Mosquitoes in Western Turkey, *Journal of Vector Ecology*, 2018, **43**(1), 44-51.

Muslu H., Manisa Bölgesinde Saptanan Sivrisinek Türleri (Dipteria: Culicidae) ve Bunların Vektöryel Önemleri, Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa, 2009, 256162.

Ortman B. D., Bucklin A., Pages F., Youngbluth M., DNA Barcoding the Medusozoa Using mtCOI. *Deep-Sea Res Pt II*, 2010, **57**, 2148-2156.

Öter K., Günay F., Tüzer E., Linton Y.M., Bellini R., Alten B., First Record of *Stegomyia albopicta* in Turkey Determined by Active Ovitrap Surveillance and DNA Barcoding, *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 2013, **13**(10), 753-761.

Öter K., İstanbul'da Görülen Sivrisinek Türlerinin Tespiti, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2007, 224266.

Öter K., Tüzer E., İstanbul'da Sivrisinek Türlerinin (Diptera: Culicidae) Kompozisyonu, *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2014, **40**(2), 249-259.

Parrish D.W., The Mosquitoes of Turkey. *Mosquito News*, 1959, **19**, 264-266.

Postiglione M., Tabanlı S., Ramsdale C.D., The *Anopheles* of Turkey. *Rivista di Parassitologia*, 1973, **34**(2), 127-159.

Ramsdale C.D., Alten B., Çağlar S.S., Özer N., A Revised, Annotated Checklist of the Mosquitoes (Diptera, Culicidae) of Turkey, *European Mosquito Bulletin*, 2001, **9**, 18-28.

Reinert J. F., Revised List of Abbreviations for Genera and Subgenera of Culicidae (Diptera) and Notes on Generic and Subgeneric Changes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 2001, **17**(1), 51-55.

Sarıkaya Y., Türkiye-Suriye Sınırında Yer Alan Mülteci Kampları Çevresinde ve Mülteci Göç Yolları Üzerindeki Sivrisinek (Diptera: Culicidae) Türlerinin Tespit Edilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2017, 465319.

Schaffner F., Angel G., Geoffroy B., Hervy J-P., Rhaiem A., Brunhes J. The Mosquitoes of Europe. An Identification and Training Programme. (CD Rom), Montpellier, France: IRD Editions & EID Mediterranee, 2001.

Schaffner F., Thiéry I., Kaufmann C., Zettor A., Lengeler C., Mathis A., ve diğ., *Anopheles plumbeus* (Diptera: Culicidae) in Europe: a Mere Nuisance Mosquito or Potential Malaria Vector?, *Malar J.* 2012, **11**(1), 393.

Senevet G, Andarelli L., *Les anophèles de l'Afrique du nord et du Bassin méditerranéen*. Ed. Paris: Le Chevalier, 1956.

Shaikevich E.V., Vinogradova E.B., Bouattour A. ve diğ.**,** Genetic diversity of *Culex pipiens* Mosquitoes in Distinct Populations from Europe: Contribution of *Cx. quinquefasciatus* in Mediterranean Populations, *Parasit Vectors*, 2016, **9**(1), 47.

Shute P.G., Indigenous *P. vivax* Malaria in London Believed to Have Been Transmitted by *Anopheles plumbeus*, *Mon Bull Ministry Health Public Health Lab Serv*., 1954, **13**, 48–51.

Snow K.R., *Mosquitoes (Naturalists' Handbooks 14)*, Richmond Publ.Co. Ltd., London, 1990.

Şahin, İ., Antalya ve Çevresindeki Sivrisinekler (Diptera: Culicidae) ve Filariose Vektörü Olarak Önemleri Üzerinde Araştırmalar. II. Sivrisinek Faunasını Belirlemek Amacıyla Yapılan Çalışmalar, *Doğa Bilim Dergisi*, A2, 1984, **8**(3): 385-396.

Şahingöz Demirpolat G., İnci A., Yıldırım A., Düzlü Ö., Önder Z., Kayseri Yöresinde *Culex pipiens* Biyotipleri ve *Culex torrentium*'un Real Time PCR ile Araştırılması ve Moleküler Karakterizasyonu, *Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2018, **65**(3), 253-259.

Şakacı Z., Edirne Merkez İlçesinde Vektöriyel Öneme Sahip Sivrisinek (Diptera: Culicidae) Türlerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, 2018, 527836.

Tagliapietra V., Arnoldi D., Luca MD., Toma L. and Rizzoli A., Investigation on Potential Malaria Vectors (*Anopheles* spp.) in the Province of Trento, Italy, *Malaria Journal*, 2019, **18**(1), 151.

Tamura K., Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*, 1992, **9**, 678-687.

Tamura K., Nei M., Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 1993, **10**, 512-526.

Tan S. Y., Sung H., Carlos Juan Finlay (1833-1915): of Mosquitoes and Yellow Fever, *Singapore Medical Journal*, 2008, **49**(5), 370–371.

Topluoğlu S., Şanlıurfa Yöresindeki Anofel Larvalarının Morfolojik Ve Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması Ve Üreme Alanlarının Fiziksel Ve Ekolojik Özellikleri, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2016, 431849.

URL-1: http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/6045 (Ziyaret tarihi: 15.07.2019)

URL-2: https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw (Ziyaret Tarihi: 31 Ekim 2019)

URL-3: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi (Ziyaret Tarihi: 31 Ekim 2019)

Vermeil C, Lavillaureix J, Reeb E. On the Preservation and Transmission of the West Nile Virus by Some Arthropods, *Bull Soc Pathol Exot*., 1960, **53**, 273–279.

Vinogradova E.B., Shaikevich E.V., Ivanitsky A.V., A study of the Distribution of the *Culex pipiens* Complex (Insecta: Diptera: Methods of Identification), *Comp Cytogenet*, 2007, **1**(2), 129-138.

Wadley L., Sievers C., Bamford M., Goldberg P., Berna F., Miller C., Middle Stone Age Bedding Construction and Settlement Patterns at Sibudu, South Africa*, Science*, 2011, **334**(6061), 1388–1391.

Ward R. A., Second Supplement to “A Catalog of the Mosquitoes of the World” (Diptera: Culicidae), *Mosquito Systematics*, 1984, **16**(3), 227-270.

Ward R. A., Third Supplement to “A Catalog of the Mosquitoes of the World” (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics*, 1992, **24**(3), 177-230.

Yuval B., The Other Habit: Sugar Feeding by Mosquitoes, *Bull. Soc. Vector Ecology*, 1992, **17**(2), 150-156.

KİŞİSEL YAYINLAR VE ESERLER

Polat F., **Dede S.**, Bingöl G., Kekillioğlu A., Kocaeli'de Yayılış Gösteren Bazı Böcek Türlerinin Mitokondrial Sitokrom Oksidaz Alt Ünite 1 Geni ile Filogenetik Analizi. *Kocaeli Üni. Fen Bil. Der., 1 (2): (2018)* 62-66.

Dede S., Polat F., Bingöl G., *Aedes geniculatus* (Diptera: Culicidae) Sivrisinek Türünün Moleküler Karakterizasyonu, *International Euroasian Conference*, Ankara, 26-27 Nisan, 2018.

ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında İstanbul'da doğdu. İlk öğrenimini Muğla'da, orta ve lise öğrenimini Aydın'da tamamladı. 2013 yılında GTS Gıda Kontrol Laboratuvarı'nda, 2014 yılında Beylikdüzü Medicana International Hospital Laboratuvarında ve 2015-2017 yılları arasında Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi Laboratuvarında stajlar yaptı. 2017 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. Halen Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalında yüksek lisans yapmaktadır.